

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FISILOGIA E FARMACOLOGIA

**EFEITO DO BLOQUEIO DO RECEPTOR MAS EM CAMUNDONGOS COM
INFLAMAÇÃO PULMONAR ALÉRGICA CRÔNICA, SUBMETIDOS A
TREINAMENTO AERÓBIO DE MODERADA INTENSIDADE**

JULIANA FABIANA GREGÓRIO

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. MARIA JOSÉ CAMPAGNOLE-SANTOS

BELO HORIZONTE – MG
2016

JULIANA FABIANA GREGÓRIO

**EFEITO DO BLOQUEIO DO RECEPTOR MAS EM CAMUNDONGOS COM
INFLAMAÇÃO PULMONAR ALÉRGICA CRÔNICA, SUBMETIDOS A
TREINAMENTO AERÓBIO DE MODERADA INTENSIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. MARIA JOSÉ CAMPAGNOLE-SANTOS

BELO HORIZONTE – MG
2016

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

(Marcel Proust)

*Dedico este trabalho a Deus;
À minha família;*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua misericórdia que se renova a cada manhã, por seu amor, cuidado e proteção. Por ter me dado condições de realizar esse trabalho.

A minha família pelo apoio e compreensão. Por sempre me incentivar e me impulsionar na conquista dos meus objetivos.

A minha orientadora, Prof^ª. Maria José Campagnole-Santos pela oportunidade e pelo privilégio de ser sua orientanda, por realmente me orientar e contribuir para a minha formação.

A Giselle Magalhães, por sua amizade, e por todo apoio que me ofereceu durante estes dois anos de mestrado. Obrigada por me ajudar na realização dos experimentos. Acima de tudo, muito obrigada por ser um exemplo de dedicação e amor à pesquisa.

A minha amiga Héllia Nascimento, muito obrigada por sua amizade sincera e verdadeira. Obrigada por estar sempre disposta a me ajudar.

Aos amigos e professores do laboratório de Hipertensão.

A Prof^ª. Maria Aparecida Ribeiro Vieira e aos meus amigos do laboratório de Fisiologia Renal.

A FAPEMIG e CAPES pelo apoio e financiamento concedidos.

LISTA DE ABREVIATURAS

A779	Antagonista do receptor MAS
Ang	Angiotensina
AT1	Receptor de angiotensina II do tipo 1
AT2	Receptor de angiotensina II do tipo 2
AVE 0091	Agonista não peptídico do receptor Mas
CCL	<i>Chemokine ligand</i> - Quimiocina ligante
ECA	Enzima conversora de angiotensina I
ECA2	Enzima conversora de angiotensina do tipo 2
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPO	Peroxidase eosinofílica
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
i.p.	Intraperitoneal
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
LBA	Lavado Broncoalveolar
Mas	Receptor da Angiotensina-(1-7)
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos 1
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NAG	N-acetilglucosaminidase
NFκ-β	<i>Factor nuclear kappa β</i>
NO	Oxido Nítrico
OVA	Ovalbumina

PGC1- α	<i>PPAR-γ co-activator-1 α</i> Coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TEMP	Teste de esforço máximo progressivo
TGF- β 1	Fator Transformador de Crescimento do tipo beta
Th2	Linfócitos T Helper 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRE	Treinamento físico de moderada intensidade
VCAM-1	Proteína 1 de adesão de células vasculares

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1- Potenciais mecanismos que contribuem para os efeitos anti-inflamatórios do exercício.....	13
Figura 2- Visão simplificada da cascata do sistema renina-angiotensina.....	18
Figura 3- Representação esquemática dos efeitos não cardiovasculares da Ang-(1-7) via receptor Mas, em diferentes tecidos e processos.	24
Figura 4- Protocolo experimental – Indução da asma e treinamento aeróbio.....	27
Figura 5- Expressão do mRNA do PGC1- α no músculo sóleo.....	37
Figura 6- Efeito do treinamento aeróbio sobre o desempenho físico	38
Figura 7- Efeito do treinamento aeróbio no ganho de peso corporal.....	40
Figura 8- <i>Box plots</i> de escore histológico do infiltrado inflamatório peribrônquico (A), perivascular (B) e do parênquima pulmonar (C).....	43
Figura 9- Efeito do treinamento aeróbio sobre a atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO, DO/mg de tecido), Peroxidase eosinofílica (EPO, DO/mg de tecido) e N-acetilglucosaminidase (NAG, DO/mg de tecido).....	45
Figura 10- Imagens representativas de cortes histológicos do pulmão mostrando a deposição de matriz extracelular nas vias aéreas.....	47
Figura 11- Área de deposição de matriz extracelular na via aérea, expressa em porcentagem.....	47

Figura 12- Efeito do treinamento aeróbio (TRE) na expressão proteica de fibronectina no tecido pulmonar.....	48
Figura 13- Imagens representativas de cortes histológicos do pulmão mostrando a parede alveolar.....	49
Figura 14- Espessamento da parede alveolar, expresso em μm^2	50
Figura 15- Imagens representativas de cortes histológicos do pulmão mostrando bronquíolos.....	51
Figura 16- Índice de broncoconstrição.....	51
Figura 17- Efeito do treinamento aeróbio (TRE) sobre a expressão proteica do receptor Mas no tecido pulmonar.....	52

TABELAS

Tabela 1- Sequência de <i>Primers</i> utilizados.	33
Tabela 2- Peso corporal.....	39
Tabela 3- Níveis Séricos de IgE específica à OVA expresso em U/ml.....	41

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	3
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Asma	9
1.2 Asma e Exercício	11
1.3 Sistema Renina-Angiotensina	17
1.4 Sistema Renina-Angiotensina e Asma	20
1.5 Angiotensina-(1-7) e Exercício Físico	22
2. OBJETIVO GERAL E ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Estratégia experimental	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Animais	26
3.2 Grupos Experimentais	26
3.3 Indução de inflamação pulmonar alérgica crônica (Asma)	26
3.4 Treinamento Aeróbio	28
3.5 Infusão com antagonista do receptor Mas, A779	28
3.6 Avaliação do peso dos animais	29
3.7 Eutanásia dos animais	29
3.8 Avaliação dos níveis séricos de IgE	29
3.9 Análise histológica	30
3.9.1 Remodelamento das vias aéreas; deposição de matriz extracelular	30
3.9.2 Remodelamento das vias aéreas; Espessamento da parede alveolar	30
3.9.3 Escore histológico de inflamação	31
3.10 Técnica de Westem blotting	31
3.11 Avaliação da expressão do mRNA de PGC1- α por qRT-PCR	32
3.12 Determinação da atividade de Mieloperoxidase (MPO) e Peroxidase Eosinofílica (EPO)	34

3.13	Técnica para dosagem da atividade de N-acetilglucosaminidase (NAG).....	35
3.14	Análise estatística.....	35
4.	RESULTADOS.....	36
4.1	Expressão gênica do PGC1- α	36
4.2	Teste de esforço máximo progressivo (TEMP)	37
4.3.	Evolução do peso corporal	39
4.4	Níveis séricos de IgE específica à OVA	40
4.5	Escore inflamatório	42
4.6	Ensaio de Atividade enzimática (MPO, EPO e NAG).....	44
4.7	Análise da deposição de matriz extracelular nas vias aéreas	46
4.8	Expressão proteica de fibronectina no tecido pulmonar	48
4.9	Análise do espessamento da parede alveolar	49
4.10	Índice de broncoconstrição	50
4.11	Expressão proteica do receptor Mas	52
5.	DISCUSSÃO.....	53
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

RESUMO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas que envolve várias células em particular linfócitos T, mastócitos, eosinófilos, neutrófilos e células epiteliais. No presente estudo, avaliamos a participação da angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] receptor Mas nos efeitos benéficos do treinamento aeróbio em um modelo experimental de asma. Camundongos Balb/c foram submetidos a um protocolo crônico de asma (sensibilização com OVA), infundidos cronicamente com o antagonista do receptor Mas, o A779 (1µg/h), e treinados 5x/semana (moderada intensidade/esteira). Os níveis séricos de IgE foram determinados por ELISA, o remodelamento das vias aéreas por histologia, a infiltração de células inflamatórias por ensaio de atividade enzimática. Além disso, o desempenho físico foi determinado por teste de esforço máximo. A expressão gênica do PGC1- α foi determinada por qRT-PCR, a expressão proteica do receptor Mas e de fibronectina foi determinada por Western blotting. Os principais resultados obtidos foram, o tratamento com A779 impediu a redução dos níveis séricos de IgE, a redução da deposição de matriz extracelular nas vias aéreas, a redução do espessamento da parede alveolar e a redução da atividade da enzima MPO nos animais asmáticos treinados. A expressão proteica do receptor Mas no pulmão não foi alterada em nenhum grupo experimental. O treinamento aeróbio foi confirmado pelo aumento da expressão gênica de PGC1- α nos animais controle e asmáticos. Estes dados sugerem que a ativação do receptor Mas está envolvida, pelo menos em parte, nos efeitos anti-inflamatórios e anti-fibróticos induzidos pelo treinamento aeróbio de moderada intensidade em animais submetidos a um modelo experimental crônico de asma.

ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammatory airway disease that involves multiple cells in particular T-lymphocytes, mast cells, eosinophils, neutrophils and epithelial cells. In the present study, we evaluated the participation of the angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] receptor Mas, in the beneficial effects of aerobic training in an experimental model of asthma. Balb/ c mice were subjected to a protocol chronic asthma (OVA sensitization), infused with the Mas receptor antagonist, A779 (1 μ g/h), and trained 5x/week (moderate/ treadmill). The serum IgE levels were determined by ELISA, the airway remodelling by histology, infiltration of inflammatory cells by enzyme activity assay. Furthermore, the physical performance was determined by maximum effort test. The gene expression of PGC-1 α was determined by qRT-PCR, protein expression of the Mas receptor and fibronectin by Western blotting. The main results were, treatment of asthmatic and trained animals with A779 prevented the reduction in serum IgE levels, reduction in extracellular matrix deposition in the airways, reduction in the alveolar wall thickening, reduction in MPO enzyme activity. Protein expression of the Mas receptor in the lung was not altered. Physical training was confirmed by the increase in PGC1- α in control or asthmatic animals. These data suggest that Mas receptor activation is involved, at least in part, in the anti-inflammatory and anti-fibrotic effect of aerobic training animals subjected to an experimental model of chronic pulmonary lung inflammation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Asma

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas que envolve várias células em particular linfócitos T, mastócitos, eosinófilos, neutrófilos e células epiteliais (Holgate e cols., 2003; Kudo e cols., 2013). A asma é considerada um problema mundial de saúde pública, acometendo cerca de 300 milhões de indivíduos. Estima-se que no Brasil, existam aproximadamente 20 milhões de asmáticos (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2012).

Clinicamente, os indivíduos asmáticos apresentam episódios de sibilância, dispnéia, opressão torácica e tosse, particularmente à noite e/ou no início da manhã. A asma não pode ser prevenida ou curada, mas as manifestações clínicas podem ser controladas de forma eficaz, através do tratamento adequado. Quando a asma está controlada a ocorrência de sintomas é mínima e exacerbações graves são raras. Sendo que a presença de sintomas diurnos ou noturnos, a necessidade de medicação de alívio e a função pulmonar são os parâmetros utilizados para a classificação do controle dessa doença (GINA, 2012).

Uma característica fundamental da asma associada à sensibilização alérgica é a capacidade das vias aéreas em reconhecerem o alérgeno e iniciarem uma resposta imune do tipo Th2. O processo de sensibilização ao alérgeno tem início, com a sua captura pelas células dendríticas, também denominadas de células apresentadoras de antígenos. Uma vez que essas células capturam o alérgeno, elas migram para órgãos linfóides locais (pulmão) onde ocorre a apresentação de antígenos (Holgate, 2008). O contato das células dendríticas com os linfócitos T *naive* (indiferenciados) promove a diferenciação desses linfócitos em

linfócitos Th2. As principais citocinas produzidas por esses linfócitos são a IL-4, IL-5 e IL-13. As IL-4 e IL-13 estimulam linfócitos B, a se tornarem linfócitos B comprometidos com a produção de imunoglobulina E (IgE). A IgE se caracteriza como sendo o anticorpo envolvido nas respostas alérgicas. Esse anticorpo se liga aos receptores de alta afinidade para IgE presentes na superfície celular dos mastócitos, basófilos e eosinófilos que são tipos celulares ricos em mediadores inflamatórios. Em um segundo contato com o mesmo antígeno, esse se liga a IgE já presente na superfície celular, desencadeando a degranulação e liberação de vários mediadores inflamatórios como histamina, serotonina, leucotrienos, prostaglandinas e citocinas, que por sua vez dão início a ativação e ao recrutamento de células inflamatórias para o tecido pulmonar (Jornsdottir e Cypcar, 1999; Todo-Bom e cols., 2006).

A IL-5 é responsável pelo recrutamento, diferenciação e sobrevivência de eosinófilos nas vias aéreas (Holgate, 2008; Pelaia e cols., 2015). Eosinófilos são granulócitos circulantes que correspondem a 3% dos leucócitos presentes na circulação sanguínea. Eles são os principais tipos celulares que podem ser recrutados para o sítio inflamatório, durante uma resposta inflamatória alérgica. A função dos eosinófilos na asma se caracteriza pela liberação de grânulos tóxicos, espécies reativas de oxigênio, citocinas e mediadores lipídicos. Os mediadores inflamatórios derivados desse tipo celular contribuem principalmente para o dano epitelial, hipersecreção de muco, hiperresponsividade e remodelamento das vias aéreas (Kudo e cols., 2013).

O tratamento com corticosteróides inalatórios leva a redução dramática de eosinófilos no escarro de pacientes asmáticos, sugerindo que essas células são fundamentais para a disfunção das vias aéreas, sendo um dos principais alvos para esta classe de fármaco (Holgate, 2008).

Nos últimos anos cresceu o interesse na investigação dos mecanismos envolvidos nas alterações estruturais das vias aéreas, ou seja, o remodelamento. O remodelamento das vias aéreas se define como alterações estruturais irreversíveis com consequente agravamento da broncoconstrição, contribuindo assim para a perda da função pulmonar (Mauad, 2000).

As mudanças estruturais incluem: descamação epitelial, fibrose subepitelial, aumento da massa muscular do músculo liso, diminuição da distância entre o músculo liso das vias aéreas e o epitélio, hiperplasias de células caliciformes, proliferação de vasos sanguíneos e desenvolvimento de edema nas vias aéreas (Sumi e Hamid, 2007). O crescente interesse pelas alterações estruturais das vias aéreas surgiu pela observação da diminuição da função pulmonar de caráter irreversível ao longo do tempo em pacientes asmáticos. Alguns estudos mostraram que mesmo na ausência de sintomas clínicos, indivíduos asmáticos possuem alterações persistentes da função pulmonar (Mauad, 2000).

1.2 Asma e Exercício

O sedentarismo é apontado como um fator de risco para diversas doenças, enquanto que, a iniciativa por um estilo de vida saudável, incluindo a prática regular de atividade física fornece proteção contra diversas doenças cardiovasculares e metabólicas (Petersen e Pedersen e cols., 2005). O treinamento físico utilizado como uma alternativa terapêutica na asma é um método não invasivo, de fácil acesso e saudável (Pakhale e cols., 2013).

O efeito anti-inflamatório do exercício está relacionado a três possíveis mecanismos como sumarizado na **Figura 1**: a redução da gordura visceral, liberação de citocinas anti-inflamatórias provenientes da contração da musculatura esquelética durante a prática do exercício (denominadas miocinas) e a redução da expressão de receptores *toll-like* em monócitos e macrófagos, com subsequente inibição da produção de citocinas pro-

inflamatórias e da expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e de moléculas co-estimuladoras. Além disso, estudos experimentais mostraram que o efeito anti-inflamatório do exercício também envolve outros mecanismos, como a inibição da infiltração de monócitos e macrófagos no tecido adiposo. Apesar desse tipo de análise ser difícil de concluir em humanos, análise de sangue periférico após a realização do exercício revelou uma redução no número de monócitos circulantes e aumento do número de linfócitos T regulatórios, células que produzem interleucinas anti-inflamatórias como a IL-10 e IL-1ra. Sugerindo que este mecanismo também possa estar envolvido nos efeitos anti-inflamatórios do exercício em humanos (Gleeseon e cols., 2011).

O treinamento aeróbio induz alterações transitórias no sistema imunológico. A intensidade, a duração e a modalidade do exercício determinam as alterações ocorridas durante e após o esforço físico. O exercício regular, ou treinamento aeróbio de intensidade moderada estimula de maneira positiva as funções do sistema imune, enquanto o treinamento intenso e de longa duração está associado à imunossupressão (Leandro e cols., 2007).

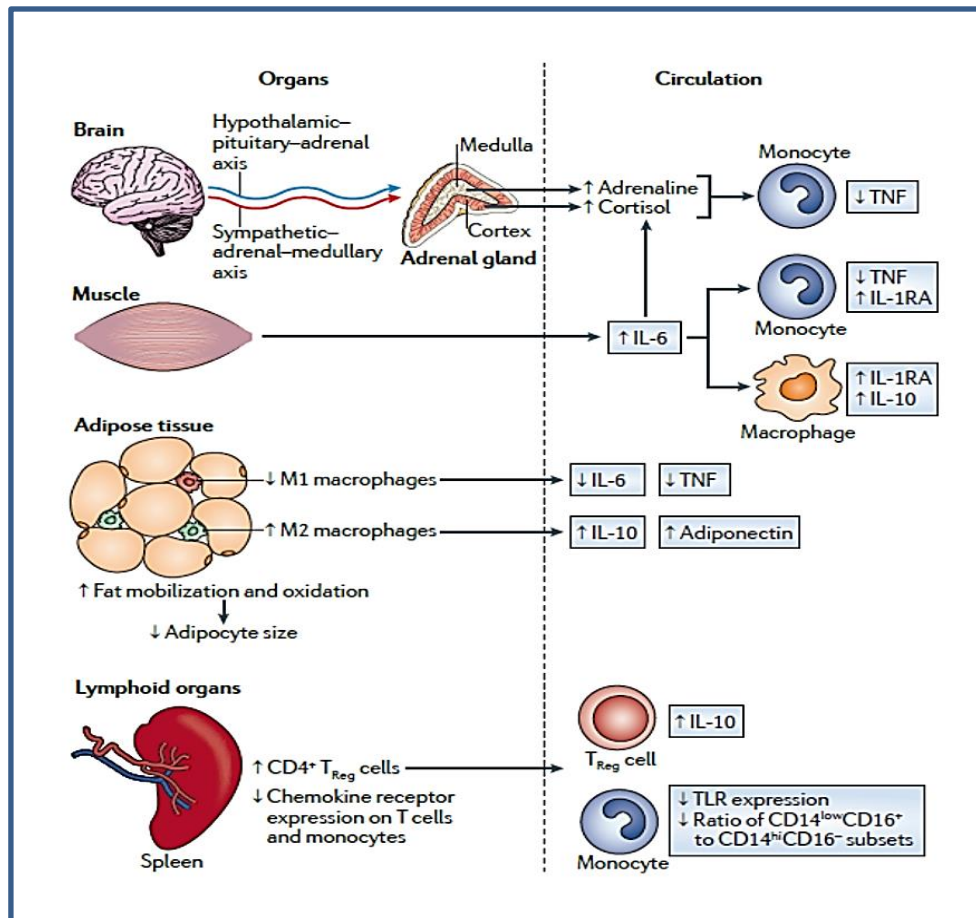


Figura 1. Possíveis mecanismos que contribuem para os efeitos anti-inflamatórios do exercício físico. A ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal e do sistema nervoso simpático (SNS) leva à liberação de cortisol e adrenalina pelo córtex e medula da adrenal, respectivamente. Esses hormônios inibem a liberação do Fator de Necrose Tumoral (TNF) por monócitos. A interleucina-6 (IL-6) produzida pela contração do músculo esquelético também regula negativamente a produção de TNF por monócitos e pode estimular ainda mais a liberação de cortisol. A elevação aguda dos níveis de IL-6 estimula a liberação do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) a partir de monócitos e macrófagos, aumentando assim a concentração circulante desta citocina anti-inflamatória. O treinamento físico mobiliza células T regulatórias (T regs), importante fonte da citocina anti-inflamatória IL-10, e reduz a razão de monócitos inflamatórios (CD14^{low} CD16⁺) para monócitos clássicos (CD14^{hi} CD16⁻). O exercício físico induz redução na expressão de receptores Toll-like 4 (TRL4) de monócitos (CD14^{hi} CD16⁻) e, assim, induzem uma resposta inflamatória reduzida marcada por baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias e redução da infiltração no tecido adiposo. O exercício também aumenta as concentrações plasmáticas de quimiocinas chaves de células imunes; a elevação dessas citocinas pode levar a *downregulation* dos seus receptores celulares, resultando na redução da infiltração tecidual. A redução da massa do tecido adiposo e no tamanho do adipócito, juntamente com a redução da infiltração de macrófagos e a interrupção do fenótipo dos macrófagos M1 para M2, pode contribuir para a redução na liberação de citocinas pró-inflamatórias (como IL-6 e TNF) e um aumento na liberação de citocinas anti-inflamatórias (como as adiponectinas e IL-10) pelo tecido adiposo. Extraído de Gleeson e cols., 2011.

Estudos recentes indicam que o declínio da atividade física pode ter um importante papel na gravidade e no aumento da prevalência da asma (Boyd e cols., 2012; Dugger e cols., 2013). O treinamento aeróbio em modelos experimentais se mostra capaz de atenuar a inflamação e a hiperreatividade das vias aéreas. Além disso, muitos estudos clínicos sugerem a prática regular de exercícios físicos, como parte de um programa de reabilitação pulmonar, pois possibilita o melhor controle da asma, redução do número de internações hospitalares e do consumo de corticosteróides (Boyd e cols., 2012), além de melhorar a função pulmonar e a qualidade de vida dos pacientes (Luks e cols., 2013).

O principal objetivo do manejo da asma é a obtenção do controle da doença, sendo que o controle se refere a extensão com a qual as manifestações da asma estão suprimidas, espontaneamente ou através de tratamento. O controle da asma compreende dois domínios distintos, o controle das limitações clínicas atuais e a redução dos riscos futuros (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2012). O tratamento clínico dessa doença está baseado na utilização de broncodilatadores e corticosteroides com o objetivo de reduzir a inflamação das vias aéreas, os sintomas clínicos, as limitações na vida diária e as limitações presentes na realização de exercícios físicos (Mendes e cols., 2010). No entanto, o treinamento aeróbio pode ser considerado como uma ferramenta não farmacológica para o controle da asma (Boyd e cols., 2012).

Ainda não está bem estabelecido na literatura se os benefícios decorrentes do treinamento aeróbio em indivíduos asmáticos são proporcionados pela atenuação da inflamação das vias aéreas, pelas adaptações cardiorrespiratórias e musculoesqueléticas, ou até mesmo pela combinação destes fatores (Parhale e cols., 2013).

Um aspecto controverso sobre a prática regular de exercícios físicos em indivíduos asmáticos se refere ao broncoespasmo induzido pelo exercício, que é definido como a broncoconstrição das vias aéreas após a realização do exercício físico (Tan e Spector,

1998). O broncoespasmo induzido pelo exercício é uma condição limitante para à prática de exercícios físicos em indivíduos asmáticos em qualquer faixa etária (adultos e crianças). Interessantemente, baixos níveis de atividade física foram associados a hiperreatividade brônquica em crianças asmáticas (Brasholt, Baty e Bisgaard, 2010).

Poucos estudos clínicos se propuseram a elucidar o efeito do treinamento aeróbio sobre a inflamação das vias aéreas. Mendes e cols. (2010) mostraram que um programa de treinamento aeróbio de 12 semanas aumentou o número de dias livres dos sintomas clínicos da asma e, além disso, reduziu o número de eosinófilos presentes no escarro de pacientes com asma moderada e grave. França-Pinto e cols. (2015) observaram redução da hiperresponsividade brônquica e redução dos níveis séricos de IL-6 e da proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1). Porém, não foram observadas alterações na expressão de IL-5, IL-8 e IL-10 após 12 semanas de treinamento aeróbio. Melhora na qualidade de vida foi observada nestes dois estudos.

Os modelos experimentais de asma são uma importante ferramenta utilizada para o avanço da nossa compreensão dessa complexa doença respiratória, que envolve vários tipos celulares, e se relaciona à diferentes fenótipos (Pelaia e cols., 2015). A ovalbumina (OVA), proteína isolada do ovo, é classicamente utilizada na indução de modelos experimentais de asma. Animais sensibilizados e expostos à OVA, submetidos a um protocolo de treinamento aeróbio apresentam atenuação das principais alterações fisiopatológicas presentes na asma, a saber, a inflamação das vias aéreas, o remodelamento pulmonar e a hiperresponsividade brônquica (Vieira e cols., 2004; Patsva e cols., 2004; Silva e cols., 2010; Hewitt e cols., 2010).

De maneira recorrente em modelos experimentais, o treinamento aeróbio reduz a expressão de citocinas características de uma resposta imune do tipo Th2, responsáveis por orquestrar o processo inflamatório na asma, resultando no recrutamento e permanência de

células inflamatórias nas vias aéreas, estímulo a síntese de IgE pelas células B e hiperresponsividade brônquica. Assim, o treinamento aeróbio se mostra capaz de modular parâmetros inflamatórios e estruturais das vias aéreas, conferindo à ele um papel imunomodulador (Patsva e cols., 2004; Vieira e cols., 2007; Silva e cols., 2010).

O efeito benéfico do treinamento aeróbio em modelos experimentais de asma pode ser constatado a longo e médio prazo, ou até mesmo de forma aguda, com apenas uma única sessão de exercício físico de moderada intensidade (Patsva e cols., 2004; Vieira e cols., 2007; Hewitt e cols., 2008). No entanto, mais estudos são necessários para o avanço da nossa compreensão dos mecanismos subjacentes, aos efeitos benéficos proporcionados pelo treinamento aeróbio na asma, benefícios estes, que são capazes de modular a resposta inflamatória e o remodelamento das vias aéreas.

Patsva e cols. (2004) foram os primeiros autores a investigarem o papel do treinamento aeróbio em um modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica. Esses autores mostraram que o treinamento aeróbio de moderada intensidade (50-75% VO₂ Máximo) reduz a expressão da molécula de adesão celular 1 (VCAM-1) e induz menor ativação do fator de transcrição NFκ-β no pulmão desses animais. Dugger e cols. (2013) mostraram que o treinamento aeróbio altera a capacidade migratória de células T isoladas a partir dos pulmões de camundongos sensibilizados e expostos à OVA, devido à redução das quimiocinas CCL1 e CCL17.

Outra célula de essencial importância na fisiopatologia da asma é o linfócito B, ou simplesmente célula B. As células B desempenham um papel crucial na imunidade adaptativa dos mamíferos, através de sua capacidade de detectar e processar antígenos, se diferenciarem em plasmócitos, ou seja, células especializadas na produção de anticorpos (Chan e cols., 2015). A IgE é o anticorpo envolvido nas respostas alérgicas, sendo que a formação do complexo antígeno-anticorpo, ou seja, a ligação específica do antígeno ao

anticorpo, decorre com a degranulação de células como mastócitos, basófilos e eosinófilos e conseqüentemente, a liberação de vários mediadores inflamatórios.

A alteração dos níveis séricos de IgE pelo treinamento aeróbio é controversa na literatura. Vieira e cols. (2007) e Olivo e cols. (2012) não observaram alteração de IgE em animais sensibilizados e expostos à OVA e submetidos à um protocolo de treinamento aeróbio. No entanto, Da Silva e cols. (2010) observaram redução de IgE, quando os animais sensibilizados e expostos à OVA, foram treinados anteriormente ao processo de sensibilização. Patsva e cols. (2004), também observaram redução dos níveis séricos de IgE específica à OVA em animais sensibilizados e expostos à OVA, submetidos a um protocolo de treinamento aeróbio após o início do processo de sensibilização.

1.3 Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é considerado um dos mais importantes sistemas reguladores da homeostase cardiovascular e hidroeletrólítica. A sua influência sobre as funções cardiovasculares e renais é extremamente ampla e complexa, envolvendo múltiplos mediadores, receptores e mecanismos de sinalização intracelular variados (Santos e cols., 2000; Santos e cols., 2008). Classicamente o SRA era considerado como uma via hormonal circulante onde o substrato liberado pelo fígado, o angiotensinogênio, uma α -glicoproteína era hidrolisada na circulação pela aspartil protease, renina, secretada pelas células justaglomerulares dos rins, formando assim o decapeptídeo Ang I. Por sua vez, a enzima conversora de angiotensina (ECA), uma metaloproteinase predominante na circulação pulmonar, remove dois aminoácidos C-terminais (His-Leu) da Ang I formando o octapeptídeo Ang II, considerado o principal peptídeo ativo do SRA (Paul, Mehr e Kreutz, 2006). No entanto, atualmente sabe-se que outros peptídeos podem ser formados, incluindo Ang-(2-8) Ang III, Ang-(3-8) Ang IV, Ang-(1-7), Ang-(1-12), Ang-(1-9) e Alamandina. A cascata de formação do SRA e as principais enzimas e receptores envolvidos estão

sumarizados na **Figura 2** (Santos e cols., 2003; Paul, Mehr e Kreutz, 2006; Santos e cols., 2008; Lautner e cols., 2013).

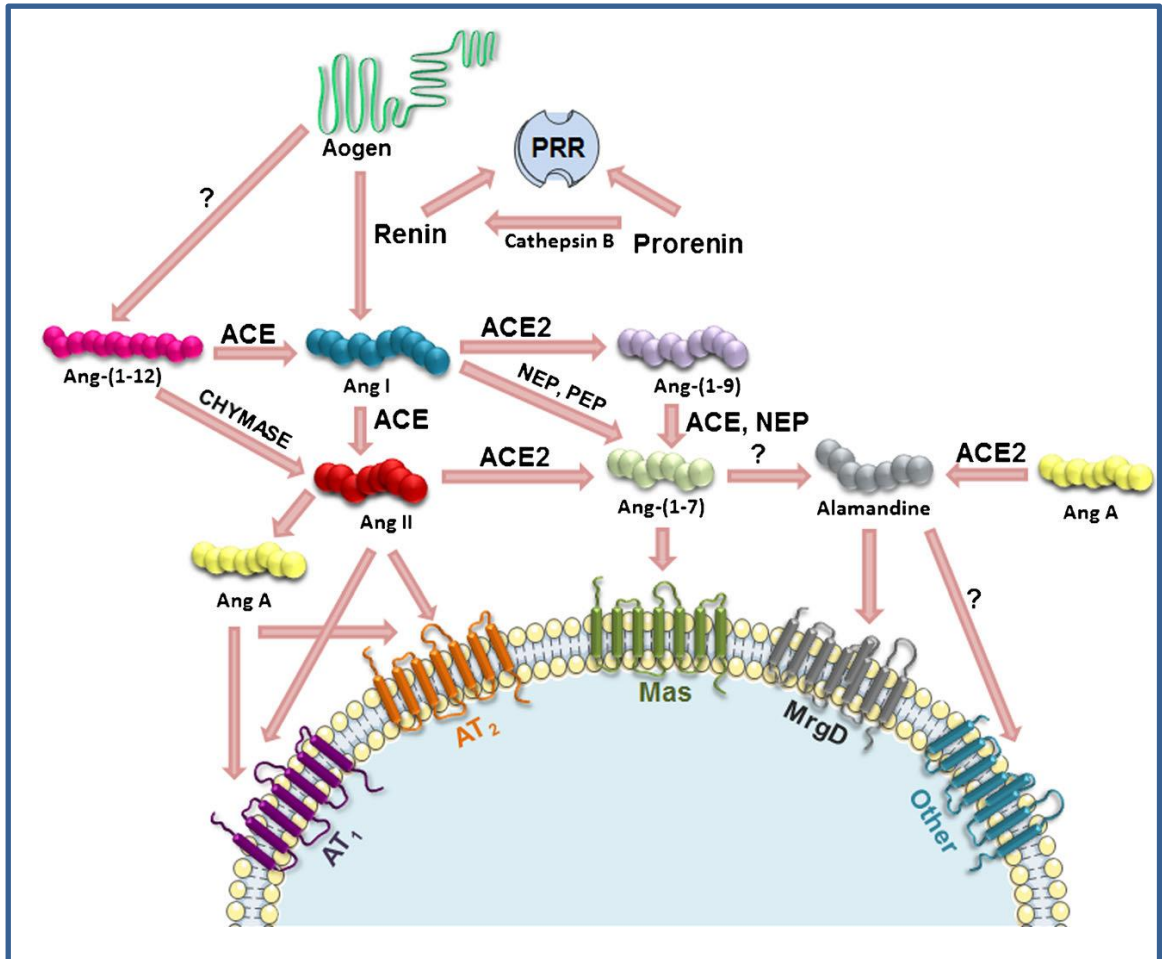


Figura 2. Visão simplificada da cascata de formação dos peptídeos do sistema renina-angiotensina e seus principais receptores. ACE, Enzima Conversora de Angiotensina I; ACE2, Enzima Conversora de Angiotensina tipo 2; Ang, angiotensina; AOPEN, angiotensinogênio; AT1, Receptor de Angiotensina Tipo 1; AT2, Receptor de Angiotensina Tipo 2; MAS, receptor da Ang-(1-7); MrGD, receptor da família Mas acoplado a proteína G do tipo; NEP, Endopeptidase neutra; PEP, prolil-carboxipeptidase; PRR, Receptor de pre-pró-renina. Extraído de Etelvino, Peluso e Santos, 2014.

Estudos realizados nas duas últimas décadas mostraram que além do eixo clássico, formado por ECA/Ang II/ Receptor AT1, existe um segundo eixo formado por ECA2/Ang-(1-7)/Receptor Mas (Santos e cols., 2003; Santos e cols., 2008). Evidências sugerem que o equilíbrio entre a ativação destes dois eixos, desempenha um importante papel na manutenção da homeostase de vários órgãos e sistemas. Um desequilíbrio favorecendo o eixo Ang II/ ECA/ Receptor AT1, por outro lado, pré-dispõe à incidência de doenças cardiovasculares (Passos-Silva, Verano-Braga e Santos, 2013). Adicionalmente, estudos recentes mostram que o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Receptor Mas está relacionado na fisiopatologia da asma (EL-Hashim e cols., 2012; Rodrigues-Machado e cols., 2013; Magalhães e cols., 2015).

Por muitos anos a Ang-(1-7) foi considerada como um peptídeo inativo do SRA. Este conceito começou a mudar após estudos de Schiavone e cols, (1988), que demonstraram que a Ang-(1-7) foi equivalente a Ang II para estimular a liberação de vasopressina de explantes hipotálamo-neurohipofisários e Campagnole-Santos e cols. (1989) que descreveram redução da pressão arterial após microinjeção de baixas doses de Ang-(1-7) no núcleo do trato solitário. Atualmente a Ang-(1-7) é considerada um peptídeo biologicamente ativo do SRA, que apresenta ações anti- inflamatória, anti-fibrótica, anti-hipertensiva, anti-proliferativa, anti-arritmogênica, anti-angiogênica e vasodilatadora. Essas ações são opostas as ações exercidas pela Ang II via receptor AT1. Fato este que torna esse peptídeo particularmente interessante (Santos e cols., 2003; Santos e cols., 2008; Passos-Silva, Verano-Braga e Santos, 2013).

A maioria das ações da Ang-(1-7) são mediadas pelo receptor Mas, um receptor de membrana acoplado a proteína G. Até o momento, todas as ações desencadeadas pela Ang-(1-7) via receptor Mas são bloqueadas pelo peptídeo D-Ala⁷-Ang-(1-7), o A779, considerado antagonista seletivo deste receptor. O receptor Mas está amplamente

distribuído em vários tecidos como o cérebro, coração, rim, pulmão, endotélio e leucócitos (Santos e cols., 2003; Simões e Silva e cols., 2013; Magalhães e cols., 2015).

O bloqueio do receptor Mas aumenta a fosforilação das proteínas ERK $\frac{1}{2}$ e I κ B- α e o número de células inflamatórias no LBA de camundongos submetidos a um modelo de inflamação pulmonar alérgica aguda (EL-Hashim e cols., 2012). Além disso, o A779 acentua a fibrose hepática e a liberação da potente citocina pró-fibrótica, o TGF- β , em um modelo experimental de fibrose hepática (Pereira e cols., 2007) e exacerba as alterações histopatológicas presentes na musculatura esquelética de camundongos Mdx, que representam um modelo experimental de distrofia muscular (Acunã e cols., 2014).

1.4 Sistema Renina-Angiotensina e Asma

Muitos estudos mostraram que o SRA, além de suas conhecidas ações nas funções cardiovasculares e renais, desempenha um papel relevante na patogênese das doenças inflamatórias (Ruiz-Ortega e cols., 2001; Capettini e cols., 2012). A presença de vários componentes do SRA em células do sistema imune (macrófagos, linfócitos, células dendríticas e neutrófilos) fornece uma base molecular para a sua atuação nas doenças inflamatórias (Simões e Silva e cols., 2013).

As ações pró-inflamatórias exercidas pelo SRA são atribuídas a Ang II, atuando através do receptor AT1. Níveis elevados de Ang II foram observados em indivíduos apresentando asma severa grave. Além disso, a administração intravenosa de Ang II provocou broncoconstrição em pacientes com asma moderada. Adicionalmente, a Ang II potencializa a ação broncoconstritora induzida pela metacolina nas vias aéreas de humanos tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Millar e cols., 1994; Millar e cols., 1995). Em pacientes asmáticos e na via aérea de ratos, o efeito broncoconstritor foi atribuído à ativação do receptor AT1 (Myou e cols., 2000; Sakai e cols., 2010).

O recrutamento de leucócitos para os tecidos é um evento coordenado que envolve a produção de quimiocinas e moléculas de adesão (Simões e Silva e cols., 2013). A regulação migratória de leucócitos e a sua ativação por quimiocinas são funções potencialmente importantes na indução de reações inflamatórias agudas e crônicas (Conti e DiGiacchino, 2003). Interessantemente a Ang II estimula a expressão das quimiocinas, MCP-1 e RANTES, em modelos experimentais. Além disso, este potente peptídeo também é capaz de induzir a síntese de quimiocinas em células endoteliais humanas (Mateo e cols., 2006). Vários trabalhos sugerem o bloqueio do receptor AT1 como uma estratégia farmacológica para o tratamento de patologias inflamatórias, evidenciando assim, o papel irrevogável conferido à Ang II nos processos inflamatórios.

Recentemente três estudos mostraram que o eixo contra-regulatório formado por ECA2/Ang-(1-7)/Receptor Mas, também pode influenciar a resposta inflamatória aguda ou crônica em modelos experimentais de asma (EL-Hashim e cols., 2012; Rodrigues-Machado e cols., 2013; Magalhães, e cols., 2015). Os efeitos da Ang-(1-7) mediados pelo receptor Mas, em sua maioria, se opõem aos efeitos da Ang II, através do receptor AT1, como sumarizado na **Figura 3**, em relação as ações não cardiovasculares do receptor Mas. Neste contexto Ang-(1-7), através do receptor Mas, exerce efeitos inibitórios sobre o recrutamento celular e o remodelamento pulmonar.

EL-Hashim e cols. (2012) mostraram que camundongos submetidos a um modelo agudo de inflamação pulmonar alérgica e tratados com Ang-(1-7), apresentaram redução do número de células inflamatórias no LBA, redução do infiltrado de células inflamatórias nas regiões perivascular e peribrônquica. Adicionalmente, a Ang-(1-7) reduziu a expressão das moléculas de sinalização celular ERK $\frac{1}{2}$ e I κ B- α . Corroborando com esses dados, nosso grupo mostrou que a Ang-(1-7) modula negativamente a expressão de citocinas relacionadas a resposta imune do tipo Th2, a expressão gênica de colágeno do tipo I e

colágeno do tipo III no tecido pulmonar. Os animais tratados com Ang-(1-7) apresentaram uma arquitetura pulmonar semelhante à arquitetura pulmonar apresentada pelos animais do grupo controle (Magalhães e cols., 2015). Em outro trabalho do nosso grupo, nós mostramos que o tratamento com AVE 0991, um análogo não peptídico da Ang-(1-7), atenuou o remodelamento pulmonar e a hiperreatividade das vias aéreas, induzida por carbacol, uma substância broncoconstritora (Rodrigues Machado e cols., 2013).

1.5 Angiotensina-(1-7) e Exercício Físico

Um dos mecanismos pelos quais o treinamento aeróbio exerce seus efeitos benéficos é através do equilíbrio entre a atividade do eixo formado por ECA/Ang II/ Receptor AT1 e o eixo formado por ECA2/ Ang-(1-7)/ Receptor Mas (Shah e cols., 2012). Gomes-Filho e cols. (2008) investigaram o efeito do treinamento de natação sobre os níveis plasmáticos e cardíacos de Ang-(1-7) em ratos SHR. O treinamento de natação induziu um seletivo e substancial aumento de Ang-(1-7) no ventrículo esquerdo de ratos SHR (Gomes-Filho e cols., 2008). Além disso, potencializou o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) sobre os anéis da artéria aorta de ratos SHR (Silva e cols., 2011). Por outro lado, camundongos com deficiência genética do receptor Mas (Mas-KO), não se beneficiam do processo de hipertrofia fisiológica induzida pelo treinamento de natação (Guimarães e cols., 2012). Estes animais apresentam aumento da expressão gênica de colágeno tipo I e colágeno tipo III, associado a aumento dos níveis de Ang II no ventrículo esquerdo (Guimarães e cols., 2012).

Em conjunto, esses dados sugerem que o treinamento aeróbio é capaz de ativar o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Receptor Mas, aumentando os níveis cardíacos de Ang-(1-7) e potencializando o efeito vasodilatador da Ang-(1-7). Além disso, a hipertrofia fisiológica induzida pelo treinamento aeróbio, parece envolver a participação do receptor Mas.

Até o presente momento não há na literatura estudos que avaliaram a participação do SRA nos efeitos induzidos pelo treinamento aeróbio em um modelo de asma aguda ou crônica. Considerando que a interação Ang-(1-7) receptor Mas reduz a inflamação e o remodelamento em modelos experimentais de asma. O treinamento aeróbio desempenha um papel imunomodulador atenuando as alterações fisiopatológicas da asma. Além disso, o treinamento aeróbio aumenta os níveis teciduais de Ang-(1-7) em modelos de hipertensão arterial. Nossa hipótese é que parte dos efeitos benéficos induzidos pelo exercício na fisiopatologia da asma podem estar relacionados à ativação do receptor Mas.

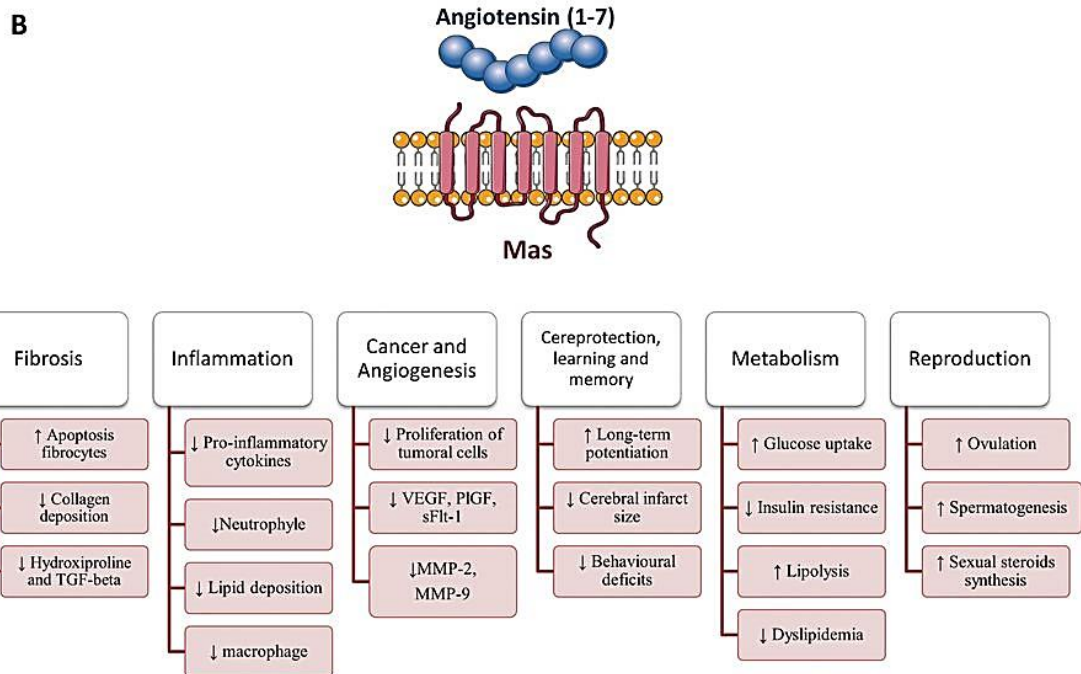
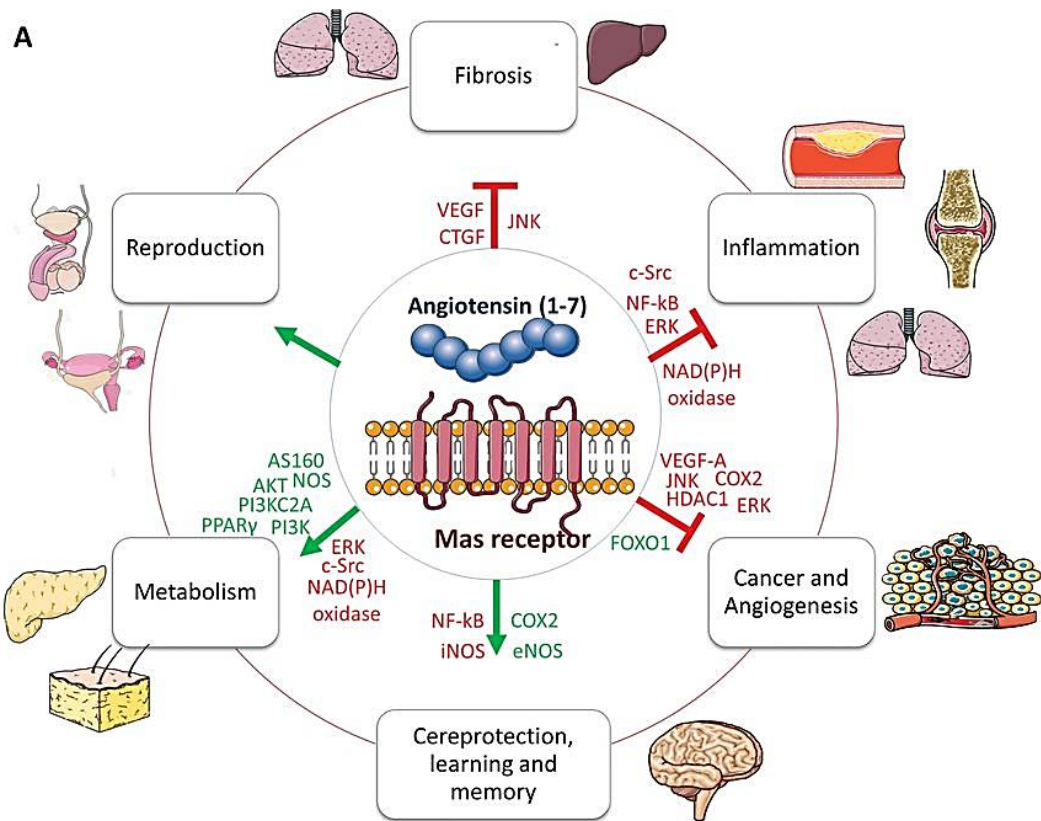


Figura 3. Representação esquemática dos efeitos não cardiovasculares da Ang-(1-7) via receptor Mas, em diferentes tecidos e processos. (A) Moléculas de sinalização envolvidas nas ações da Ang-(1-7). As moléculas em verde e vermelho indicam ativação ou inibição da Ang-(1-7)/receptor Mas respectivamente. As setas verdes indicam ativação ou efeitos positivos e as linhas vermelhas indicam inibição dos processos. (B) As principais consequências não cardiovasculares da Ang-(1-7) em cada processo. Extraído de Passos-Silva, Verano-Braga e Santos, 2013.

2 OBJETIVO GERAL E ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o envolvimento da Ang-(1-7) nos efeitos produzidos pelo treinamento físico sobre a inflamação e o remodelamento de vias aéreas em camundongos submetidos a um modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica induzida por ovalbumina (OVA).

2.2 Estratégia experimental

Avaliar o efeito da infusão crônica do antagonista do receptor da Ang-(1-7), receptor Mas, (A779) em animais sensibilizados e expostos à OVA e submetidos à treinamento aeróbio de moderada intensidade, sobre:

- 1) o grau de inflamação pulmonar, avaliando-se a atividade de enzimas marcadoras de células inflamatórias e o grau do infiltrado celular no tecido pulmonar;
- 2) o grau de remodelamento brônquico e pulmonar, avaliando-se a deposição de matriz extracelular e espessura da parede alveolar;
- 3) a expressão proteica do receptor Mas e de fibronectina no tecido pulmonar por Western blotting;
- 4) o grau de imunização pela dosagem de IgE específica para OVA no plasma.
- 5) as adaptações fisiológicas ao treinamento aeróbio através do TEMP e da expressão gênica do PGC1- α no músculo sóleo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Nesse estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/c, que no início do protocolo experimental tinham 8 semanas de idade e pesavam entre 20-25 gramas. Os animais foram obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO), do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidos em ambiente com luminosidade e temperatura controlada (período de claro/escuro de 12/12 h) e alimentados com água e ração apropriada. O projeto, contendo todos os procedimentos cirúrgicos e experimentais descritos a seguir, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA), da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo nº 11/ 2014).

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos (inicialmente com 8 animais por grupo):

- Camundongos Controle- Sedentários (CTRL –SED)
- Camundongos Controle- Treinados (CTRL-TRE)
- Camundongos Controle- Treinados-A779 (CTRL-TRE-A779)
- Camundongos Asmáticos- Sedentários (OVA-SED)
- Camundongos Asmáticos- Treinados (OVA-TRE)
- Camundongos Asmáticos- Treinados-A779 (OVA-TRE- A779)

3.3 Indução de inflamação pulmonar alérgica crônica (Asma)

A indução da asma foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Vieira e cols. (2007) e ilustrado na **Figura 4**. Os animais foram sensibilizados por injeções

intraperitoneal (i.p.) de ovalbumina (OVA; 20 μg / animal) diluída em solução salina (0,5 ml NaCl 0.9%) nos dias 0, 14, 28 e 42^o. No 21^o do protocolo experimental, os animais foram submetidos à inalação com OVA (1%) diluída em NaCl 0,9 %, três vezes por semana, com duração de 30 minutos por sessão, até o 46^o dia do protocolo experimental. A inalação dos animais foi realizada em caixas de acrílico (30cm x 15cm x 20cm) acopladas ao Nebulizador Ultrassônico (Soniclear Pulmosonic Star; Frequência: 50/60 Hz). Os grupos controle, não sensibilizados, receberam a administração intraperitoneal de solução salina (0,5 ml, NaCl 0.9%) e foram inalados com solução salina (NaCl, 0.9%). Esses procedimentos foram realizados nos mesmos dias e com a mesma duração a dos animais submetidos à sensibilização (asmáticos). Setenta e duas horas após a última inalação os animais foram eutanasiados, os tecidos e amostras de sangue foram coletados, congelados e armazenados a -80°C para posterior análise.

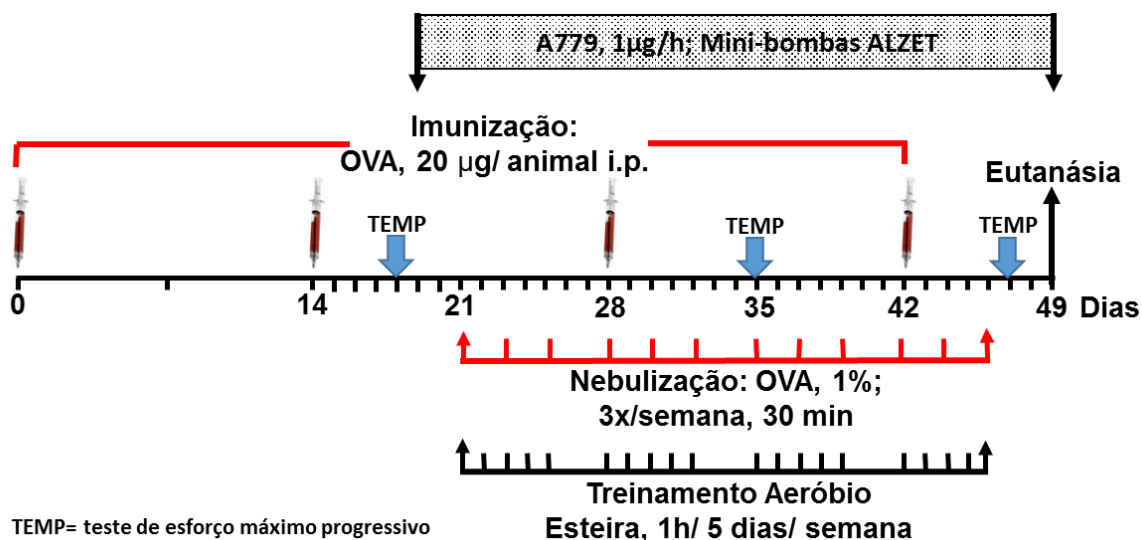


Figura 4 - Representação esquemática do protocolo experimental utilizado no presente estudo.

3.4 Treinamento Aeróbio

Os animais foram inicialmente adaptados à uma esteira motorizada (GAUSTEC Magnetismo, Brasil), por 3 dias (15 min, 0,2 Km/h). Quarenta e oito horas após o período de adaptação, os animais foram submetidos ao primeiro teste de esforço máximo progressivo (TEMP), que consistiu em 5 minutos de adaptação (0,2 km/h) seguido pelo aumento progressivo da velocidade da esteira (0,1 Km/h a cada 2,5 min) até que fosse atingida a fadiga dos animais, isto é, até que eles não fossem capazes de continuar correndo, mesmo após 10 estímulos mecânicos suaves no dorso do animal. O TEMP foi repetido após 2 semanas de treinamento com o intuito de adequar e manter a intensidade de treinamento dos animais a 60% da velocidade máxima. Ao término do período de treinamento foi realizado o último TEMP.

Determinamos como sendo a intensidade de treinamento de 60% o valor correspondente a média aritmética da velocidade máxima de cada animal em cada grupo. Assim, os camundongos foram treinados a uma intensidade moderada (60% da velocidade máxima) durante 60 minutos/ dia, 5 dias por semana. O treinamento aeróbio teve início no 21^o dia do protocolo juntamente com o início da nebulização com OVA (grupo asmático) ou com solução salina (controle) e terminou no 46^o dia do protocolo. O treinamento era realizado sempre no período da manhã (8-12h) e a inalação no período da tarde (14-18h), de maneira que, havia um intervalo de pelo menos 4 horas entre os procedimentos.

3.5 Infusão com antagonista do receptor Mas, A779

Para a realização do bloqueio crônico do receptor Mas, os animais foram anestesiados com uma solução de ketamina (60 a 80 mg/kg) associado a xilazina (8 a 15 mg/kg) por via intraperitoneal para implantação de mini-bomba osmótica ALZET® modelo

1004 (taxa infusão= 0,11 µl/hora). A mini-bomba foi preparada no dia anterior ao implante, conforme recomendação do fabricante e, implantada no tecido subcutâneo, da região interescapular, do dorso do animal. A taxa de infusão do A779 foi de 1µg/h durante 28 dias. A implantação da mini-bomba osmótica ocorreu no 19^o dia do protocolo experimental. Os animais treinados sensibilizados (OVA) ou não (Controle) foram infundidos com solução de NaCl 0,9%.

3.6 Avaliação do peso dos animais

Todos os animais foram pesados no dia 0, 14^o, 28^o, 42^o e 49^o (dia da eutanásia).

3.7 Eutanásia dos animais

Setenta e duas horas após a última inalação com OVA, os animais foram anestesiados com uma solução de ketamina (60 a 80 mg/kg) associado a xilazina (8 a 15 mg/kg) por via intraperitoneal. Após a anestesia, a traquéia foi exposta e isolada com um fio de sutura, a seguir a veia jugular foi isolada para a coleta de sangue. Após a coleta de sangue, realizamos uma toracotomia esternal para a retirada dos pulmões. Os pulmões dos animais de todos os grupos foram sub-divididos para a análise histológica, dosagem de citocinas e expressão de receptores da seguinte forma: o pulmão esquerdo foi fixado em formol tamponado a 10%; os lóbulos do pulmão direito foram divididos, colocados em tubos de polietileno, congelados imediatamente em gelo seco e posteriormente armazenados em freezer -80°C para posterior utilização.

3.8 Avaliação dos níveis séricos de IgE

Para determinar os níveis de imunoglobulina E (IgE) foi coletado 1 ml de sangue de cada camundongo com pipeta de Pasteur. As amostras foram transferidas para tubos de

polietileno e mantidas no gelo. A quantificação dos níveis de IgE específica para OVA foi realizada pelo método de ELISA, segundo especificação do fabricante do kit comercial *Shibayagi, Mouse anti-OVA IgE*.

3.9 Análise histológica

Fragmentos do pulmão foram desidratados, diafanizados, parafinados e incluídos em parafina. Cortes de aproximadamente 4 μm de espessura foram obtidos e corados com hematoxilina e eosina (H&E) para determinação da espessura do parênquima pulmonar, e tricrômio de Gomori para determinação da deposição de matriz extracelular.

3.9.1 Remodelamento das vias aéreas; deposição de matriz extracelular

Foram capturados aleatoriamente 5 imagens em cada região do pulmão (superior, media e inferior) no aumento de 400x. A área das vias aéreas, para análise foi determinada utilizando o programa Image Pro Plus IPWin 4. O número de pixels compreendidos na área de deposição de matriz extracelular nas vias aéreas foi obtido a partir da imagem real, a seguir o software apresenta uma imagem binária com o valor correspondente a deposição de matriz extracelular nas vias aéreas.

3.9.2 Remodelamento das vias aéreas; Espessamento da parede alveolar

Foram capturados aleatoriamente 5 imagens em cada região do pulmão (superior, media e inferior) no aumento de 400x. A área da parede alveolar, para análise, foi determinada utilizando o programa Image Pro Plus IPWin 4. O número de pixels compreendidos entre as paredes alveolares foi obtido a partir da imagem real, a seguir o software apresenta uma imagem binária e a medida da área correspondente em μm^2 .

3.9.3 Escore histológico de inflamação

Foram avaliadas a quantidade de células inflamatórias em 10 campos de cada região do pulmão, peribrônquica, perivascular e do parênquima, através de método semi-quantitativo estabelecido por um escore: 1= ausência de inflamação, 2= inflamação leve, 3= inflamação moderada, 4= inflamação grave (Magalhães e cols., 2015). Para esta análise, as lâminas foram numeradas por outro pesquisador para que a avaliação fosse feita de forma duplo-cega.

3.9.4 Índice de broncoconstrição

As vias aéreas de cada animal foram analisadas no aumento de 200x. A área da via aérea referente a membrana basal epitelial foi medida e denominada de perímetro externo (PE). A área referente a extremidade do epitélio respiratório foi medida e denominada como perímetro interno (PI). A relação entre estes dois perímetros (PE/PI), foi considerada como sendo o índice de broncoconstrição (Vieira e cols., 2007)

3.10 Técnica de Western blotting

A expressão proteica do receptor Mas e fibronectina foi quantificada pela técnica de Western blotting. As amostras de pulmão foram homogeneizadas em tampão de lise contendo Tris-acetato (50mM, pH 7,4), leupitina (1µg/ mL), aprotinina (1µg/ mL), pepstatina (1µg/ mL) e phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF,1mM). A concentração das proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). As proteínas totais solubilizadas (30 µg) foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/ SDS 10% a 100 V, por 1 hora e posteriormente transferidas para membrana de nitrocelulose por nova eletroforese. Em seguida, para evitar ligações inespecíficas, as membranas foram bloqueadas com Tris-Base 1M, pH 7,6 (1x) contendo 0,1 de tween 20(TBS-T) e 5% de leite

em pó desnatado *overnight*. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário (Rabbit Anti-Mas, diluição de 1:200; produzido em nosso laboratório/ Cell Signaling/ Rabbit Anti-Fibronectin, 1:200) *overnight* a 4°C. No dia seguinte as membranas foram lavadas com TBS-T 1x e incubadas com o anticorpo secundário (IRDye® 680 Conjugated Goat (polyclonal) Anti-Mouse IgG(H+L), diluição 1:10.000, Licor Biosciences) diluído em TBS-T 1x por 1 hora á temperatura ambiente. O excesso de solução foi retirado com TBS-T 1X, as membranas foram visualizadas e quantificadas no aparelho scanner Odyssey. Como controle endógeno, foi utilizado o anticorpo monoclonal Anti-GAPDH (diluição 1:000, sigma, MO, EUA).

3.11 Avaliação da expressão do mRNA de PGC1- α por qRT-PCR

O músculo sóleo foi rapidamente dissecado, congelado em gelo seco e estocado em -80°C para posterior extração do RNA. A extração do RNA total foi realizada utilizando-se o protocolo original do TRIzol reagent (Invitrogen, San Diego, CA). As amostras foram homogeneizadas utilizando tubos Precellysis MK28 e 500ul de Trizol em uma velocidade de 5500 rpm por 30 segundos. Após homogeneização, as amostras foram mantidas por 10 minutos a temperatura ambiente e adicionado 100ul de clorofórmio (Sigma). Após 5 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000 rpm a 4°C. O sobrenadante, foi transferido para novo tubo eppendorf de 1,5ml e adicionado 250 μ l de álcool isopropílico (Sigma). Após um período de incubação de 10 minutos, à temperatura ambiente, as amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos e 10000 rpm a 4°C. O precipitado foi então lavado com 1ml de etanol 75% em água depec e finalmente as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 7500 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco por 10 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, 12 μ l de água depec foi adicionado em cada amostra e estas foram

aquecidas por 10 minutos a 55°C. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em gelo até sua leitura em Nanodrop (ThermoScientific). Foram tratados 1µg de RNA com a enzima DNase Amplification Grade (RNase-free) (Sigma AMP-D1) seguindo-se o protocolo do fabricante. Para o qRT-PCR foi utilizado 1µg de RNA tratado (M-MLV RT, Invitrogen, M1705) e qPCR 60ng de cDNA (em triplicata). Foi utilizado como controle endógenos (GAPDH) e SYBR green reagent (Qiagen) na plataforma 384 Wells do aparelho ViiA™ 7 System (Applied Biosystems). A equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizada para se comparar os níveis de expressão gênica entre os grupos (Pfaffl, 2001).

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados

Gene	Sequência
PGC1- α FW	5'-GGAGCTCCAAGACTCTAGACA-3
PGC1- α RV	5'-CCAAAGTCTCTCTCAGGTAGC-3
GAPDH_FW	TGCGACTTCAACAGCAACTC
GAPDH_RV	ATGTAGGCCATGAGGTCCAC

3.12 Determinação da atividade de Mieloperoxidase (MPO) e Peroxidase Eosinofílica (EPO)

O grau de infiltração de neutrófilos e eosinófilos no tecido pulmonar foi avaliado pela atividade da enzima MPO e EPO, respectivamente. A atividade destas enzimas apresenta correlação específica com o número destas células no tecido. Assim, o lóbulo médio do pulmão direito foi pesado e solubilizado em tampão fosfato de sódio, pH 5,4 (1ml/mg), as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas à 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado à -80°C para posterior dosagem de citocinas. O precipitado foi ressuscitado em salina contendo EDTA (1ml/ mg de tecido), centrifugado à 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionado NaCl 0,2% e NaCl 1,6% contendo glicose 5% gelada (1ml/ mg de tecido). As amostras foram centrifugadas novamente, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuscitado em tampão fosfato contendo HTAB 5% e homogeneizado por 30 segundos (vortex). As amostras foram congeladas e descongeladas seguidamente por 3 vezes em nitrogênio líquido, e submetidas novamente à centrifugação e o sobrenadante coletado para o ensaio. Para se determinar a atividade da mieloperoxidase (MPO), 75 µl do sobrenadante de cada amostra foi adicionado em placas de 96 poços em duplicata, incubado com 75 µl de tampão contendo TMB/H₂O₂ por 30 minutos a 37°C. Para interromper a reação adicionamos 75 µl de H₂SO₄. A densidade óptica foi medida em 450 nm. Para se determinar a atividade da enzima Peroxidase Eosinofílica (EPO), 75 µl do sobrenadante de cada amostra foi adicionado em placas de 96 poços, incubado com 75 µl de tampão mais OPD/H₂O₂ por 30 minutos a 37°C ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 75 µl de H₂SO₄ e a densidade óptica foi medida em 492 nm.

3.13 Técnica para dosagem da atividade de N-acetilglucosaminidase (NAG)

O grau de infiltração de macrófagos no tecido pulmonar foi avaliado pela atividade da enzima NAG. O precipitado obtido no processamento do pulmão, acima descrito, foi ressuspenso em 2,0 mL de solução salina 0,9% com Triton X-100 a 0,1% gelado. As amostras foram homogeneizadas em vórtex até a obtenção de uma suspensão homogênea e, posteriormente foram centrifugadas à 3.000 rpm durante 10 minutos. A seguir, 100µL do sobrenadante de cada amostra foi adicionado em placas de 96 poços em duplicata e a estes foram adicionados 100µL do substrato (p-nitrofenil-n-acetil-β-D-glicosaminidase), diluído em tampão citrato/fosfato pH 4,5, e em seguida, incubadas a 37°C durante 30 minutos. Por último, foram adicionados 100µL de tampão glicina 0,2M, pH 10,6. A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de Elisa, em comprimento de onda de 400nm.

3.14 Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Para comparação dos resultados foi utilizado o teste *one way ANOVA* seguido pelo teste de Newman-Keuls para os dados paramétricos e *ANOVA-Kruskal-Wallis* seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn para os dados não paramétricos. Para análise do TEMP foi utilizado teste *t Student*. Para análise do peso corporal foi utilizado teste *Two-Way ANOVA* seguido do teste de Bonferroni. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$. As análises foram realizadas com o auxílio do software Graph Prism (Versão 5.0)

4. RESULTADOS

4.1 Expressão gênica do PGC1- α

O PGC1- α é uma proteína co-ativadora que se liga a vários fatores de transcrição, levando a aumento da expressão de genes envolvidos na biogênese mitocondrial e aumento da função respiratória, causando aumento da capacidade enzimática para beta-oxidação de ácidos graxos, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. Aumento da expressão de PGC-1 α ocorre em situações onde há aumento da necessidade energética, como durante o treinamento físico e assim, a elevação dos níveis de PGC1- α pode ser utilizada como marcador de treinamento (Russell e cols., 2003 e Calvo e cols., 2008). A Figura 5 mostra a expressão gênica do PGC1- α no músculo sóleo dos animais estudados. Os animais dos grupos controles, CTRL-TRE e CTRL-TRE-A779 apresentaram maior aumento da expressão gênica do PGC1- α ($3,19 \pm 0,44$ u.a. e $3,56 \pm 0,68$ u.a., respectivamente; Figura 5A) quando comparados aos animais do grupo CTRL-SED ($1,21 \pm 0,21$ u.a.; Figura 5A). Da mesma forma, os animais asmáticos treinados, OVA-TRE, apresentaram maior aumento da expressão gênica do PGC1- α ($1,85 \pm 0,14$ u.a.; Figura 5B), quando comparados aos animais do grupo OVA-SED ($0,96 \pm 0,15$ a.u.; Figura 5B). Os animais do grupo OVA-TRE-A779 apresentaram tendência de aumento dos níveis de mRNA para PGC1- α ($1,62 \pm 0,48$ u.a. vs $0,96 \pm 0,15$ a.u., $p < 0,05$, teste t de Student; Figura 5B). Esses dados sugerem que o bloqueio do receptor Mas com A779, não interfere com o aumento da expressão gênica do PGC1- α que é desencadeado pelo treinamento aeróbio em animais controles ou asmáticos. É interessante observar que nos animais asmáticos treinados o aumento de PGC1- α é menor em relação aos animais controles treinados ($1,85 \pm 0,14$ u.a vs $3,19 \pm 0,44$ u.a; Figura 5B).

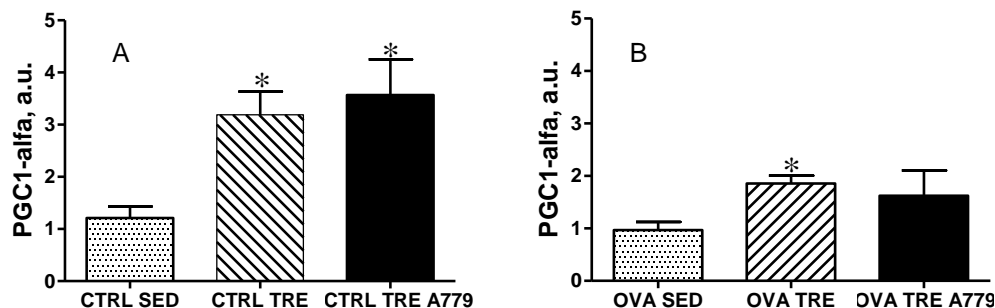


Figura 5. Expressão do *mRNA* do PGC1- α no músculo sóleo de camundongos sensibilizados (OVA) ou controles (CTRL), sedentários (SED) ou treinados (TRE), tratados com A779; n=5-7 por grupo; *p< 0,05 em comparação ao SED (One-Way ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls).

4.2 Teste de esforço máximo progressivo (TEMP)

A Figura 6 mostra o desempenho físico dos camundongos avaliado através do teste de esforço máximo progressivo (TEMP), antes e após o protocolo de treinamento aeróbio. O tempo máximo realizado neste teste pelos animais do grupo OVA-SED (29 ± 1 min; Figura 6A) foi significativamente menor que o tempo realizado no período pré-inalação, ou seja, antes da inalação com OVA ($34,2 \pm 1,4$ min; Figura 6A). Entretanto, nos animais do grupo OVA-TRE este tempo foi maior ($47,1 \pm 2,1$ min vs $39,2 \pm 1,5$ min, antes; Figura 6A), sugerindo que o treinamento físico impediu a redução de desempenho físico que é desencadeada pelo desenvolvimento da asma.

O tratamento com o A779 concomitante ao treinamento aeróbio aboliu este efeito (Figura 6A). O tempo máximo realizado pelos animais do grupo OVA-TRE-A779 foi menor em relação ao tempo realizado no período pré-inalação ($31,1 \pm 1,6$ min vs $40,6 \pm 3,8$ min, antes; Figura 6A), sugerindo que, pelo menos em parte, o efeito do treinamento se deve a Ang-(1-7). Como esperado, o grupo CTRL-TRE (Figura 6B) também aumentou o tempo máximo neste teste. De forma inesperada, os animais do grupo CTRL-SED (Figura 6B) apresentaram aumento no tempo de esforço máximo; enquanto os não asmáticos

treinados que receberam A779 (CTRL-TRE-A779 Figura 6B) apresentaram redução no tempo de esforço máximo.

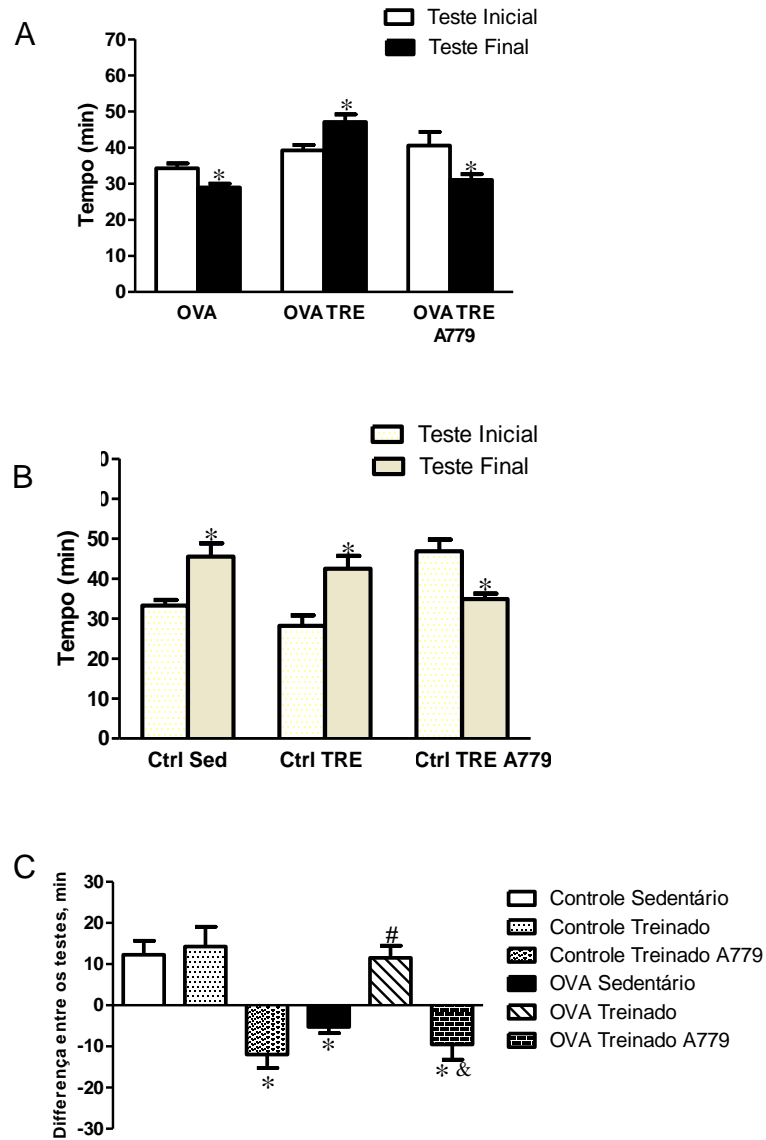


Figure 6. Efeito do treinamento aeróbio sobre o desempenho físico de camundongos não sensibilizados (CTRL) ou alérgicos (OVA), treinados (TRE) ou sedentários (SED) e tratados com o antagonista do receptor Mas (A779); 6-8 animais por grupo. * $p < 0.05$ comparado com o 1º teste (Teste t de Student); * $p < 0.05$ em comparação ao controle sedentário; # $p < 0.05$ em comparação ao OVA-SED; & $p < 0.05$ em comparação ao OVA-TER (One-Way ANOVA seguido de Newman-Keuls).

4.3. Evolução do peso corporal

A tabela 2 e a figura 7 mostram a evolução do peso corporal dos animais ao longo do protocolo experimental. Observamos que os animais do grupo OVA-SED apresentaram atenuação do ganho de peso corporal ($27,93 \pm 0,5$ g, aos 49 dias) quando comparados com os animais do grupo CTRL-TRE ($30,4 \pm 0,7$ g, aos 49 dias).

Tabela 2. Peso corporal de camundongos não sensibilizados sedentários (CTRL-SED) ou treinados (CTRL-TRE), alérgicos sedentários (OVA-SED) ou alérgicos treinados (OVA-TRE), ou tratados com antagonista do receptor Mas (A779).

Grupos	Dias						
	n	0	14	28	42	49	
CTRL-SED	6	$22,78 \pm 0,2$	$24,75 \pm 0,4^*$	$26,03 \pm 0,4^*$	$28,37 \pm 0,9^*$	$28,67 \pm 0,7^*$	
CTRL-TRE	7	$23,47 \pm 0,4$	$25,86 \pm 0,6^*$	$27,76 \pm 0,5^*$	$29,81 \pm 0,5^*$	$30,40 \pm 0,7^*$	
CTRL-TRE-A779	7	$21,96 \pm 0,6$	$25,24 \pm 0,2^*$	$26,71 \pm 0,3^*$	$27,91 \pm 0,5^*$	$29,43 \pm 0,4^*$	
OVA-SED	8	$23,71 \pm 0,3$	$25,56 \pm 0,4^*$	$27,01 \pm 0,5^*$	$27,94 \pm 0,8^*$	$27,93 \pm 0,5^* \#$	
OVA-TRE	7	$22,49 \pm 0,3$	$24,26 \pm 0,6^*$	$26,49 \pm 0,5^*$	$29,49 \pm 0,5^*$	$29,67 \pm 0,5^*$	
OVA-TRE-A779	6	$22,64 \pm 0,3$	$23,85 \pm 0,5^*$	$26,08 \pm 0,2^*$	$28,57 \pm 0,4^*$	$29,17 \pm 0,4^*$	

Valores = média \pm EPM. * $p < 0,05$ em comparação ao tempo zero (antes da 1ª imunização/ teste t de Student para observações pareadas); # $p < 0,05$ em comparação ao CTRL-TRE (*Two-Way ANOVA* seguido do teste de Bonferroni).

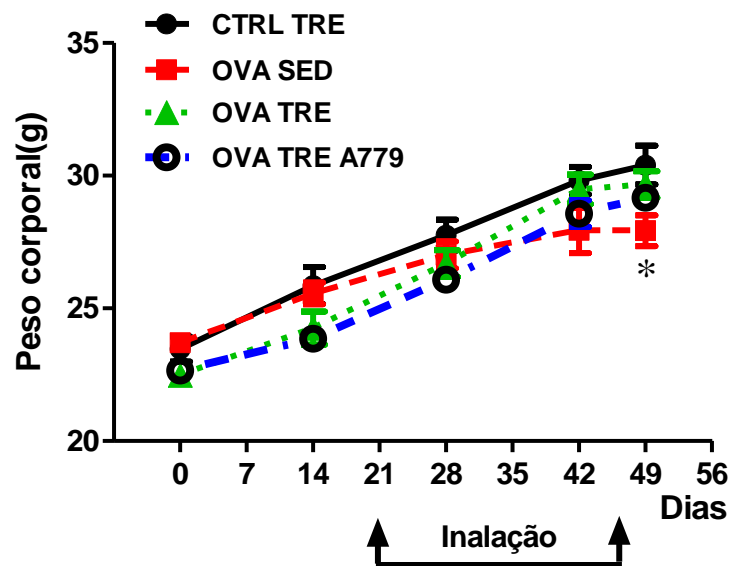


Figura 7. Efeito do treinamento aeróbio no ganho de peso corporal de camundongos não sensibilizados treinados (CTRL-TRE), alérgicos (OVA-SED), alérgicos treinados (OVA-TRE), alérgicos treinados e tratado com antagonista do receptor Mas (OVA -TRE A779); n= 6-8 animais por grupo; *p<0,05 em comparação a CTRL TRE (*Two-Way ANOVA* seguido do teste de Bonferroni).

4.4 Níveis séricos de IgE específica à OVA

A Tabela 3 mostra os níveis séricos de IgE dos animais estudados. A IgE desempenha um papel central na iniciação e propagação da cascata inflamatória na asma. Os camundongos do grupo OVA-SED apresentaram elevados níveis plasmáticos de IgE específica à OVA ($13 \pm 6,6$ U/ml) em comparação aos animais do grupo CTRL-SED ($0,00 \pm 0,0$ U/ml). No entanto, o treinamento aeróbio aboliu a produção de IgE, nos animais do grupo OVA-TRE ($0,00 \pm 0,0$ U/ml). De maneira surpreendente os níveis plasmáticos de IgE também se mostraram elevados nos animais do grupo OVA-TRE-A779 ($23 \pm 9,6$ U/ml). Estes dados mostram que o bloqueio do receptor Mas impede o efeito do exercício

aeróbio crônico sobre a supressão da síntese de IgE específica à OVA em camundongos sensibilizados e expostos a OVA. Como era esperado, não observamos alterações nos níveis plasmáticos de IgE específica à OVA nos camundongos não alérgicos (controles) treinados ou sedentários.

Tabela 3. Níveis séricos de IgE específica a OVA em camundongos não sensibilizados (CTRL-SED), não sensibilizados treinados (CTRL-TRE), não sensibilizados treinados e tratados com o antagonista do receptor Mas (CTRL-TRE A779), alérgicos (OVA-SED), alérgicos treinados (OVA-TRE), alérgicos treinados e tratado com antagonista do receptor Mas (OVA-TRE A779).

GRUPOS	n	IgE, U/ ml
CTRL-SED	5	0,0±0
CTRL-TRE	5	0,0±0
CTRL-TRE A779	5	0,0±0
OVA-SED	6	13 ± 6,6
OVA-TRE	6	0,0 ±0,0
OVA-TRE A779	5	23 ± 9,6 ^{*&}

Valores = média ± EPM. *p< 0,05 em comparação ao CTRL-SED; &p< 0,05 em comparação ao OVA-TRE (ANOVA-Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn).

4.5 Escore inflamatório

A IgE é necessária para o início do processo inflamatório das vias aéreas, uma vez que induz a infiltração e o acúmulo de células inflamatórias no tecido pulmonar. Avaliamos cortes histológicos do pulmão e classificamos o infiltrado através de um escore inflamatório (Magalhães e cols., 2015). A sensibilização e inalação com OVA aumentou de maneira significativa o infiltrado de células inflamatórias, em torno das vias aéreas na região peribrônquica ($3,5 \pm 0,28$ u.a. vs $1,6 \pm 0,3$ u.a no CTRL-SED; Figura 8 A), na região perivascular ($3,6 \pm 0,07$ u.a. vs $1,3 \pm 0,13$ u.a. no CTRL-SED; Figura 8 B). No entanto, o treinamento aeróbio atenuou o infiltrado de células inflamatórias na região peribrônquica ($2,3 \pm 0,34$ u.a.; Figura 8 A), perivascular ($2,0 \pm 0,51$ u.a.; Figura 8 B) em relação aos animais do grupo OVA-SED. Porém, observamos que a intensidade do infiltrado de células inflamatórias no grupo dos animais OVA-TRE A779 na região peribrônquica ($3,2 \pm 0,23$ u.a.; Figura 8 A) e perivascular ($3,1 \pm 0,30$ u.a.; Figura 8 B) foi semelhante ao grupo OVA-SED. Observamos aumento no infiltrado de células inflamatórias na região do parênquima pulmonar, dos animais dos grupos OVA-SED ($2,6 \pm 0,5$ u.a) e OVA TRE-A779 ($2,8 \pm 0,2$ u.a) quando comparados ao grupo CTRL-SED ($1,1 \pm 0,1$ u.a). Não observamos alterações no número de células inflamatórias nos animais dos grupos não sensibilizados, ou seja, controles sedentários ou treinados. Estes dados mostram que o bloqueio do receptor Mas atenua o efeito do treinamento aeróbio sobre o infiltrado de células inflamatórias em diferentes regiões do pulmão de camundongos submetidos ao modelo de asma crônica.

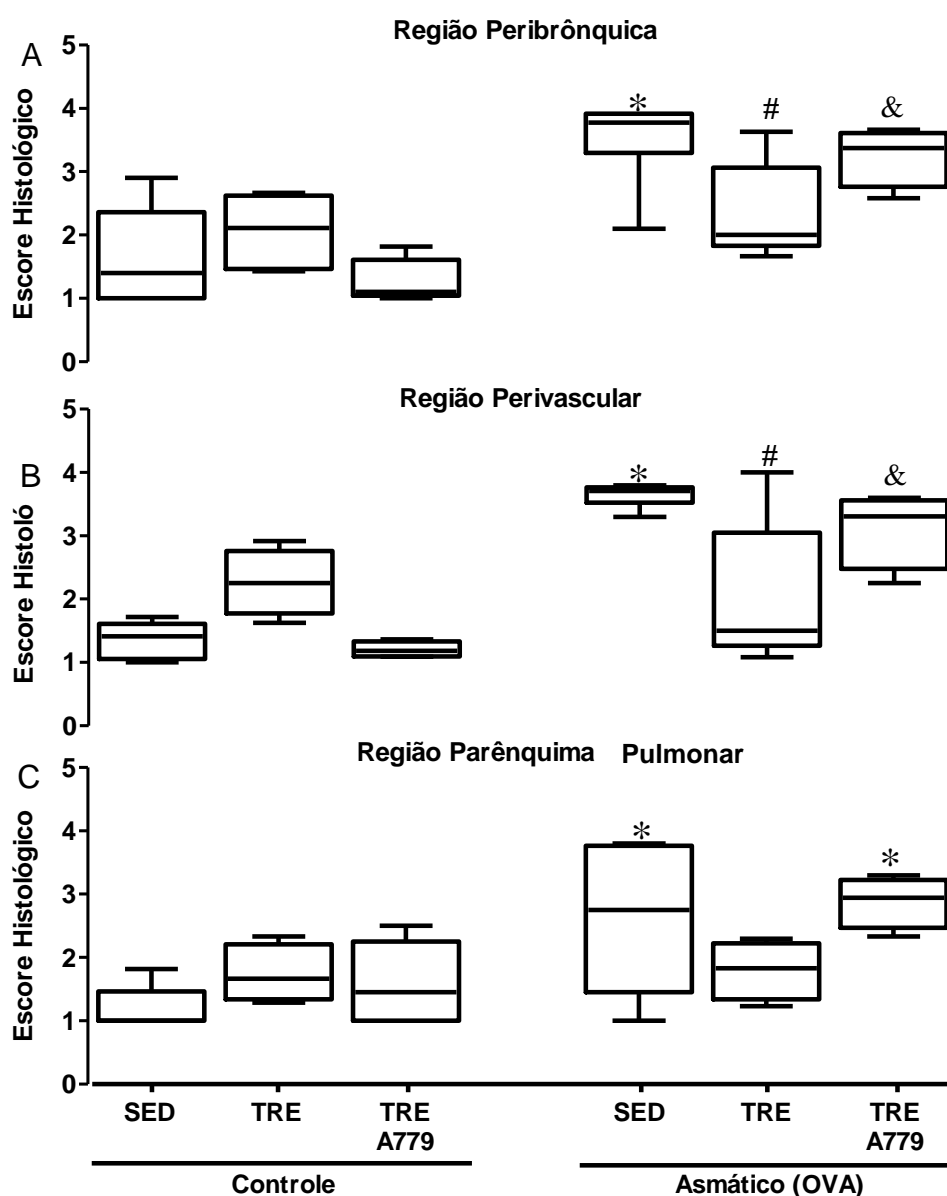


Figura 8. *Box plots* de escore histológico do infiltrado inflamatório na região peribrônquica (A), perivascular (B) e do parênquima pulmonar (C) nos grupos Controle e OVA. As caixas mostram o primeiro e o terceiro quartil, as barras mostram intervalos de 10% e 90%, e a linha horizontal representa o valor médio. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. $n = 5-8$ por grupo; * $p < 0.05$ em comparação ao controle sedentário (SED); # $p < 0.05$ em comparação ao OVA-SED; & $p < 0.05$ em comparação ao OVA-TRE (One-Way ANOVA seguido de Newman-Keuls)

4.6 Ensaio de Atividade enzimática (MPO, EPO e NAG)

Após observarmos que houve aumento do infiltrado de células inflamatórias no tecido pulmonar por histologia, avaliamos o acúmulo de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos no tecido pulmonar através da determinação da atividade das enzimas, MPO, EPO e NAG, respectivamente. Observamos maior atividade da enzima MPO nos animais do grupo OVA-SED ($1,55 \pm 0,14$ DO/mg; Figura 9A) em comparação ao grupo controle SED ($0,95 \pm 0,13$ DO/mg; Figura 9A). No entanto, o treinamento aeróbio foi capaz de inibir a atividade da MPO nos animais do grupo OVA-TRE ($1,01 \pm 0,06$ DO/mg Figura 9A). Surpreendentemente, a atividade dessa enzima nos animais alérgicos, treinados e submetidos a infusão com o antagonista do receptor Mas, A779, não foi diferente ($1,51 \pm 0,11$ DO/ mg; Figura 9A) da apresentada pelos camundongos do grupo OVA-SED ($1,55 \pm 0,14$ DO/mg; Figura 9A).

A atividade da enzima EPO se comportou de maneira semelhante a enzima MPO. Observamos aumento da atividade da enzima EPO nos animais do grupo OVA-SED ($0,38 \pm 0,03$ DO/mg; Figura 9B) em comparação aos animais do grupo CTR-SED ($0,25 \pm 0,04$ DO/mg; figura 9B). No entanto, o treinamento aeróbio foi capaz de atenuar a atividade dessa enzima ($0,24 \pm 0,02$ DO/mg; Figura 9B), ou seja, reduzir o acúmulo de eosinófilos no tecido pulmonar. Apesar de observarmos uma tendência, a atividade da enzima EPO, não estava significativamente alterada nos animais do grupo OVA-TRE-A779 ($0,30 \pm 0,03$ DO/mg figura 9 B). Não observamos diferença na atividade da enzima NAG tanto nos grupos dos animais não sensibilizados, quanto no grupo dos animais alérgicos (Figura 9C).

Em conjunto, esses dados mostram que o bloqueio do receptor Mas, atenua o efeito do treinamento aeróbio sobre a infiltração e atividade enzimática de neutrófilos e eosinófilos, no entanto o bloqueio do receptor Mas parece não influenciar na infiltração e atividade enzimática de macrófagos.

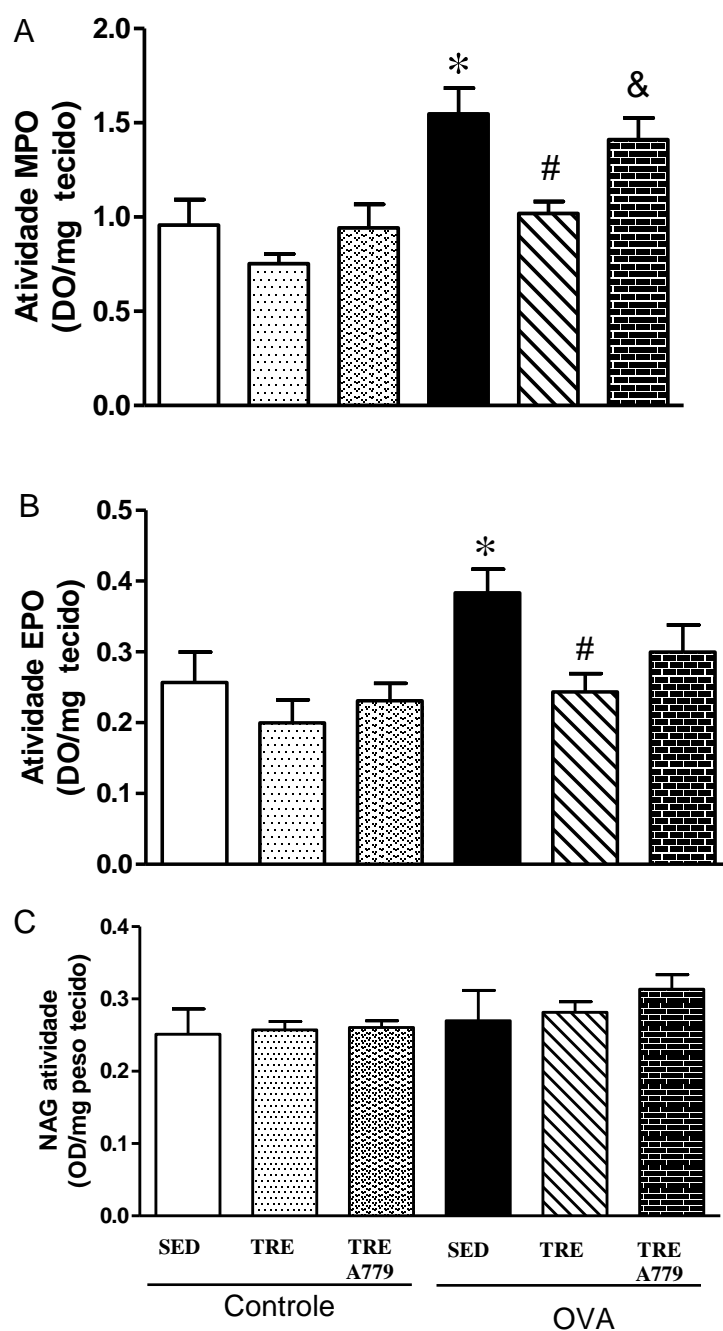


Figura 9. Efeito do treinamento aeróbio sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO, DO/mg de tecido), peroxidase eosinofílica (EPO, DO/mg de tecido) e N-acetilglucosaminidase (NAG, DO/mg de tecido) no tecido pulmonar de camundongos controle ou OVA, sedentários (SED) ou treinados (TRE), tratados com A779. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. $n=5-8$ animais por grupo; * $p < 0,05$ em comparação ao CTRL-SED; # $p < 0,05$ em comparação ao OVA-SED; & $p < 0,05$ em comparação ao OVA-TRE (One-Way ANOVA seguido de Newman-Keuls).

4.7 Análise da deposição de matriz extracelular nas vias aéreas

A Figura 10 apresenta imagens representativas de cortes histológicos do pulmão de animais dos grupos estudados, mostrando a deposição de matriz extracelular, característica do remodelamento pulmonar presente na asma. Como esperado, camundongos do grupo OVA-SED apresentaram acentuada deposição de matriz extracelular ($34 \pm 2 \%$; Figura 11) em comparação ao grupo CTRL-SED ($15 \pm 2 \%$; Figura 11). No entanto, a deposição de matriz extracelular foi atenuada pelo treinamento aeróbio de moderada intensidade (OVA-TRE= $17 \pm 2 \%$; Figura 11). Surpreendentemente, a deposição de matriz extracelular nos animais do grupo OVA-TRE-A779, não foi diferente ($32 \pm 1 \%$; Figura 11) da apresentada pelos camundongos do grupo OVA-SED. Estes dados mostram que o bloqueio do receptor Mas impede o efeito do treinamento aeróbio sobre a deposição de matriz extracelular nas vias aéreas de camundongos alérgicos. Como era esperado, não observamos alterações na deposição de matriz extracelular nas vias aéreas dos camundongos não alérgicos (controle) treinados ou sedentários.

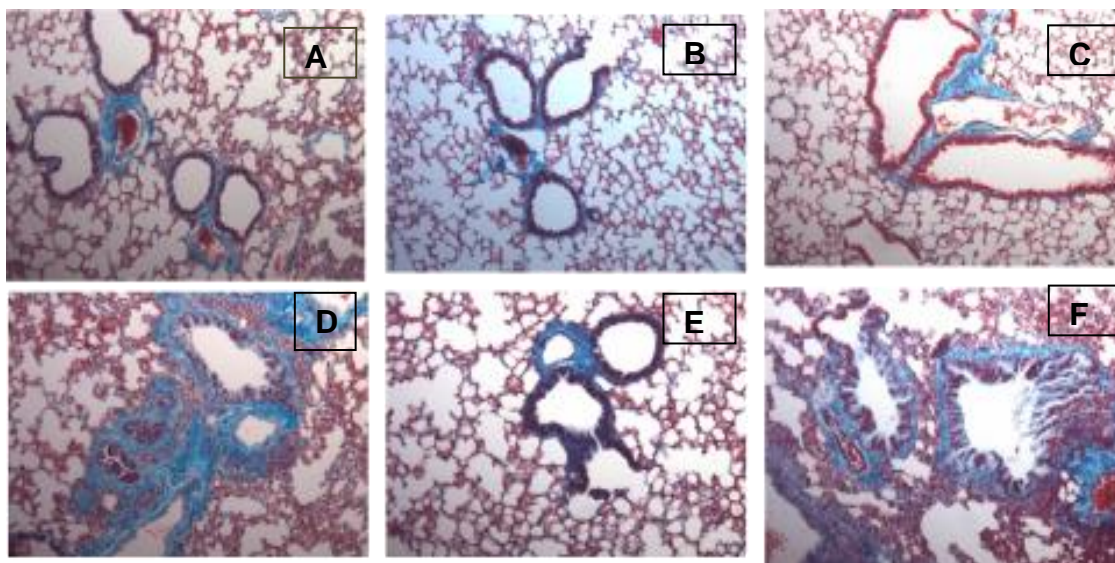


Figura 10. Imagens representativas de cortes histológicos do pulmão mostrando a deposição de matriz extracelular nas vias aéreas de camundongos não sensibilizados controle (CTRL-SED; A), não sensibilizados treinados (CTRL-TRE; B), não sensibilizados controle treinado e tratado com o antagonista do receptor Mas (CTRL-TRE-A779; C) alérgicos controle (OVA-SED; D) alérgicos treinados (OVA-TRE; E) alérgicos treinados e tratados com o antagonista do receptor Mas (OVA-TRE- A779; F).

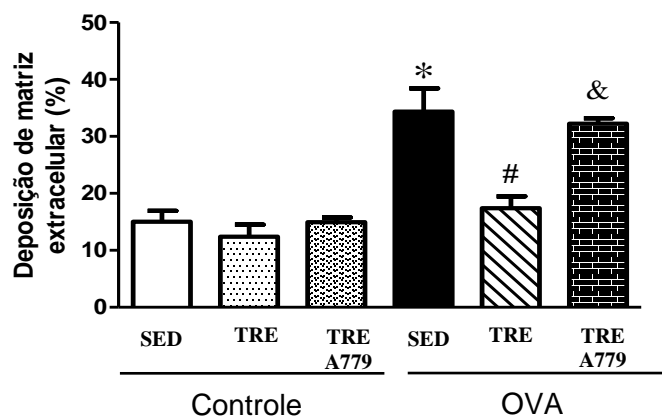


Figura 11. Área de deposição de matriz extracelular na via aérea, expressa em porcentagem. Vias aéreas de camundongos controle ou asmático (OVA), treinados ou sedentários e tratados com o antagonista do receptor Mas(A779), N= 4-5 por grupo. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0.05$ em comparação ao controle sedentário; # $p < 0.05$ em comparação ao OVA-sedentário ; & $p < 0.05$ em comparação ao OVA-treinado (One-Way ANOVA seguido de Newman-Keuls).

4.8 Expressão proteica de fibronectina no tecido pulmonar

Como mostrado na Figura 12, os animais OVA-SED apresentaram aumento na expressão de fibronectina quando comparados aos animais do grupo CTRL- SED ($0,007176 \pm$ vs $0,004555 \pm 0,0$). O treinamento aeróbio parece impedir o aumento da expressão de fibronectina, uma vez que não observamos diferença na expressão de fibronectina nos animais OVA-TRE ($0,006473 \pm 0,0$ vs $0,00457 \pm 0,0$) e os animais do grupo CTRL-SED. No entanto, os animais do grupo OVA-TRE-A779 ($0,008755 \pm 0,0$) apresentaram aumento da expressão de fibronectina quando comparado aos animais do grupo CTRL-SED ($0,004555 \pm 0,0$) e OVA-TRE ($0,006473 \pm 0,0$). Estes dados sugerem que a atenuação da expressão de fibronectina induzida pelo treinamento físico em animais asmáticos pode ser dependente da ativação do receptor Mas.

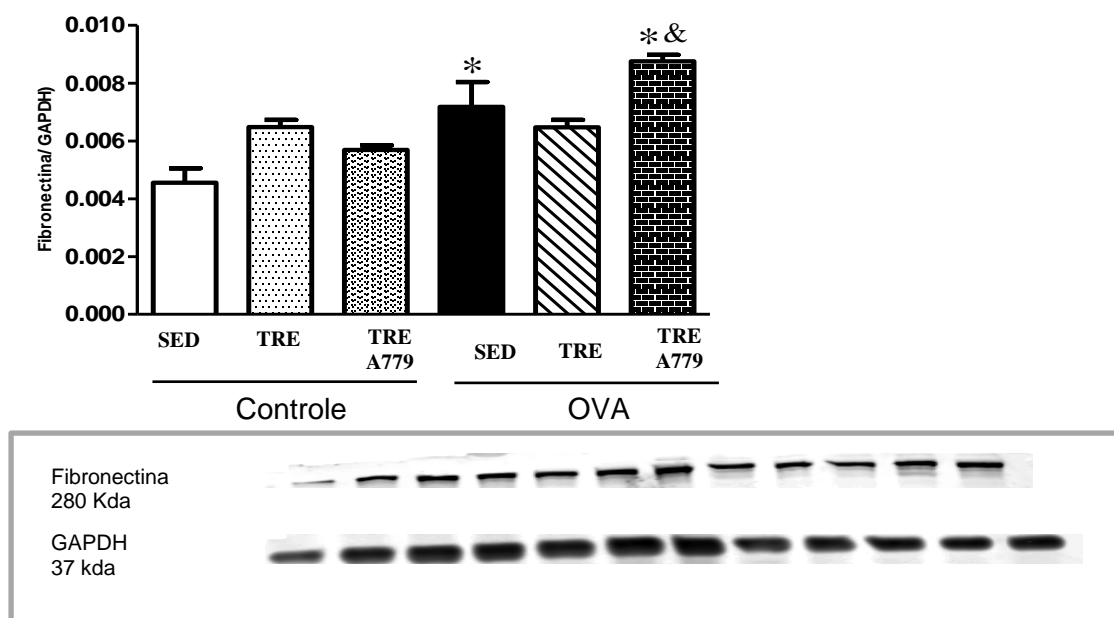


Figura 12. Efeito do treinamento aeróbio na expressão proteica de fibronectina no tecido pulmonar de animais controle (CTRL) ou asmáticos (OVA). Valores foram normalizados por GAPDH. n=4 animais por grupo. SED= sedentários. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0.05$ em comparação ao controle sedentário; & $p < 0.05$ em comparação ao OVA-treinado (One-Way ANOVA seguido de Newman-Keuls).

4.9 Análise do espessamento da parede alveolar

A Figura 13 mostra imagens de cortes histológicos de pulmão dos animais estudados ilustrando o espessamento da parede alveolar. Observamos que os animais do grupo OVA-SED apresentaram aumento da espessura da parede alveolar ($2.6 \pm 0.2 \mu\text{m}^2$; Figura 14) em comparação aos animais do grupo CTRL-SED ($1.5 \pm 0.07 \mu\text{m}^2$). No entanto, o treinamento físico atenuou o espessamento da parede alveolar ($1.8 \pm 0.09 \mu\text{m}^2$ vs $1.5 \pm 0.07 \mu\text{m}^2$ no CTRL-SED). Da mesma forma que os parâmetros anteriores, o tratamento com A779 preveniu o efeito do exercício físico, uma vez que a espessura da parede alveolar dos animais do grupo OVA-TRE-A779 não foi diferente ($3 \pm 0.3 \mu\text{m}^2$) da apresentada pelos camundongos OVA-SED ($2.6 \pm 0.2 \mu\text{m}^2$). Como era esperado, não observamos alterações na espessura da parede alveolar dos camundongos não alérgicos (controle) treinados ou sedentários.

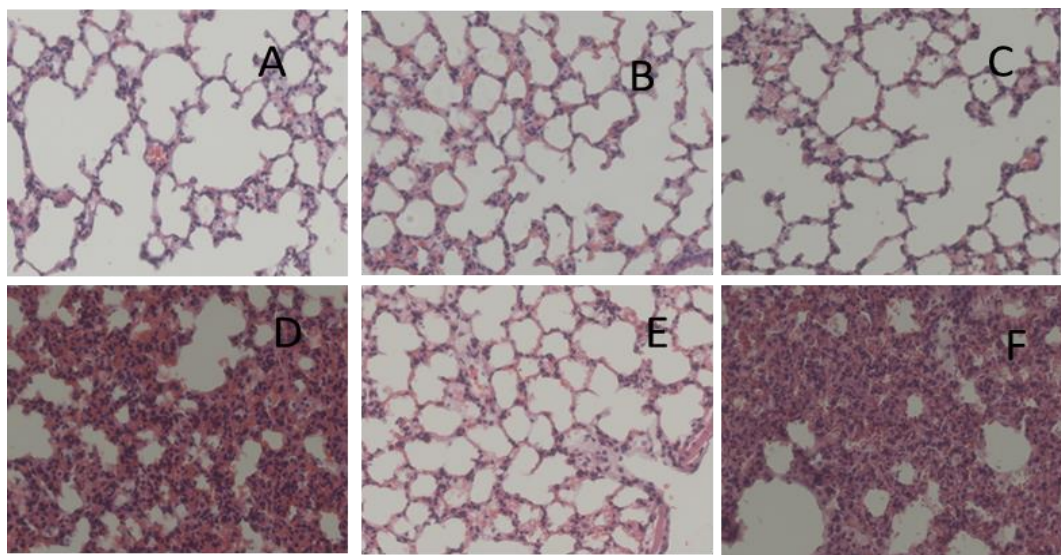


Figura 13. Imagens representativas de cortes histológicos do pulmão mostrando a parede alveolar de camundongos não sensibilizados controle (CTRL-SED, A), não sensibilizados treinados (CTRL-TRE, B), não sensibilizados treinados e tratados com o antagonista do receptor Mas (CTRL-TRE-A779), alérgicos controle (OVA-SED, D), alérgicos treinados (OVA-TRE, E), alérgicos treinados e tratados com o antagonista do receptor Mas (OVA-TRE-A779, F).

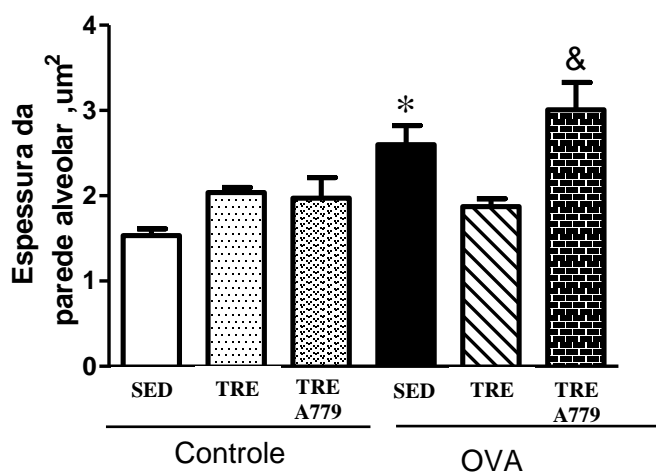


Figura 14. Espessamento da parede alveolar, expresso em μm^2 . Efeito do treinamento aeróbio (TRE) sobre a espessura da parede alveolar de animais controle ou asmáticos (OVA) e tratados com antagonista do receptor Mas (A779). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em comparação ao CTRL-SED; & $p < 0,05$ em comparação ao OVA-TRE (One-Way ANOVA seguido de Newman-Keuls).

4.10 Índice de broncoconstrição

A Figura 15 mostra imagens de cortes histológicos do pulmão dos animais estudados ilustrando o índice de broncoconstrição. Observamos que não houve alteração significativa no índice de broncoconstrição nos animais os asmáticos ($1,9 \pm 0,06$ u.a.; Figura 16) ou nos animais OVA-TRE ($2,0 \pm 0,09$ u.a) em comparação aos animais CTRL-SED ($1,8 \pm 0,04$ u.a, no). Para nossa surpresa, os animais do grupo OVA-TRE-A779 apresentaram aumento no índice de broncoconstrição ($2,9 \pm 0,25$ u.a) quando comparados a todos os outros grupos.

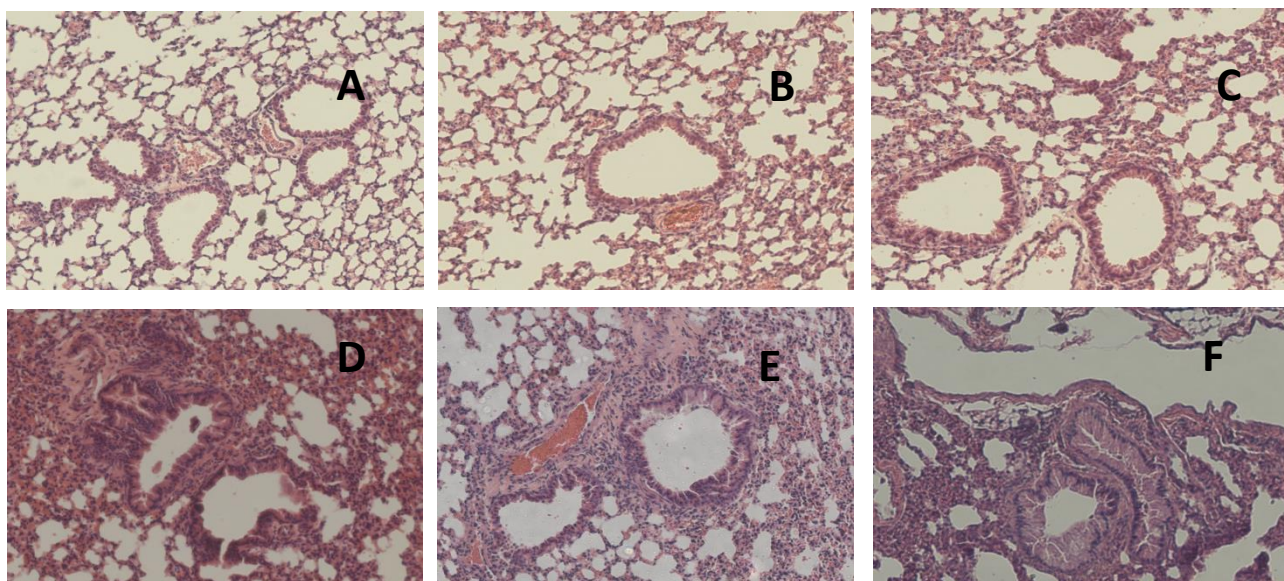


Figura 15. Imagens representativas de cortes histológicos do pulmão mostrando bronquíolos de camundongos não sensibilizados controle (CTRL-SED, A), não sensibilizados treinados (CTRL-TRE, B.), não sensibilizados treinados e tratados com o antagonista do receptor Mas (CTRL-TRE-A779), alérgicos controle (OVA-SED, D), alérgicos treinados (OVA-TRE, E), alérgicos treinados e tratados com o antagonista do receptor Mas (OVA-TRE-A779, F).

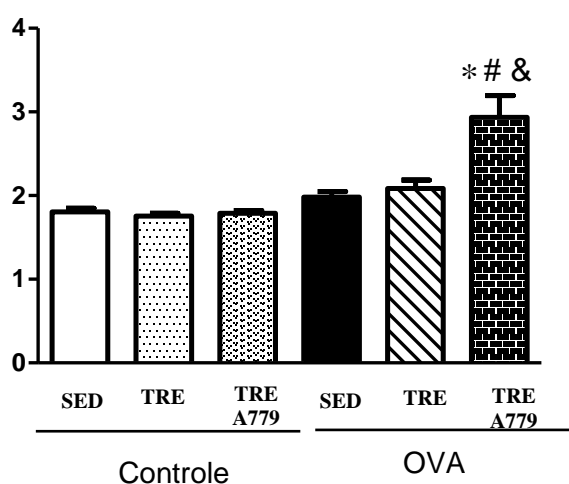


Figura 16. Índice de broncoconstrição. Efeito do treinamento aeróbio (TRE) sobre o índice de broncoconstrição de animais controle ou asmáticos (OVA) e tratados com antagonista do receptor Mas (A779). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em comparação ao controle sedentário; $^{\&}p < 0,05$ em comparação ao OVA-TREinado (One-Way ANOVA seguido de Newman-Keuls).

4.11 Expressão proteica do receptor Mas

Como pode ser observado na Figura 17 não houve alteração significativa na expressão do receptor Mas em todos os grupos estudados.

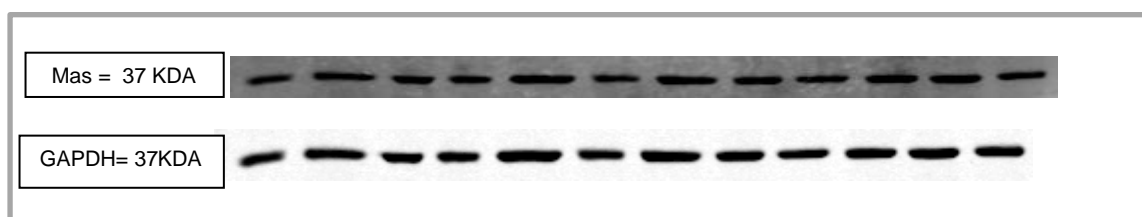
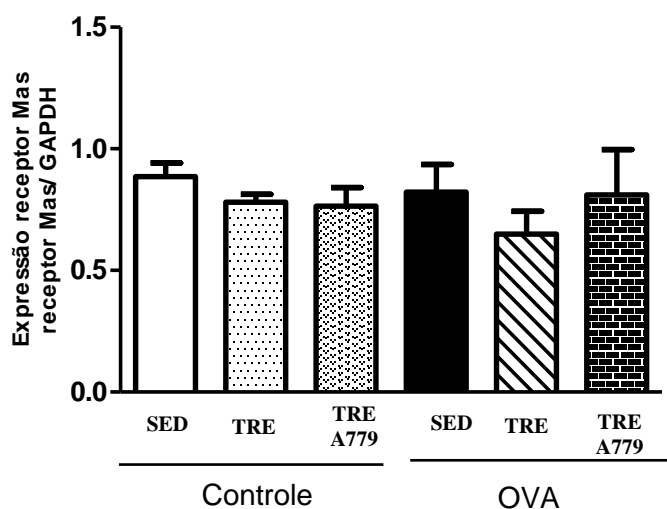


Figura 17. Efeito do treinamento aeróbio (TRE) sobre a expressão proteica do receptor Mas no tecido pulmonar de animais controle ou asmáticos (OVA) e tratados com antagonista do receptor Mas (A779). Valores foram normalizados por GAPDH. n=4 animais por grupo. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. (One-Way ANOVA seguido de Newman-Keuls).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo mostramos que o bloqueio do receptor Mas atenua os benefícios do treinamento aeróbio relacionados à inflamação e ao remodelamento das vias aéreas em camundongos submetidos a um protocolo de inflamação pulmonar alérgica crônica. Esses dados sugerem que os efeitos anti-inflamatórios e anti-fibróticos atribuídos ao treinamento aeróbio dependem, pelo menos em parte, da ativação do receptor Mas.

A primeira preocupação do presente trabalho foi verificar se os animais submetidos ao treinamento aeróbio, controles ou asmáticos, ou tratados com antagonista do receptor Mas estavam treinados. Utilizamos como indicativo de treinamento a determinação da expressão do *mRNA* para PGC1- α , considerado marcador de treinamento físico, uma vez que este cofator que modula a transcrição e está relacionado a biogênese mitocondrial induzida pelo exercício (Calvo e cols., 2008). Os animais dos grupos CTRL-TRE, OVA-TRE, CTRL-TRE-A779 apresentaram aumento da expressão de PGC1- α . O grupo OVA-TRE-A779 apresentou tendência ao aumento da expressão gênica do PGC1- α .

É interessante observar que os animais submetidos ao protocolo de asma e que treinaram apresentaram aumento menor de PGC1- α que os animais não asmáticos (controles), sugerindo que o animal asmático apresenta alteração na adaptação da musculatura esquelética ao treinamento aeróbio. No entanto, mesmo apresentando menor adaptação ao treinamento de corrida, esses animais apresentaram efeitos benéficos com relação ao desenvolvimento das alterações fisiopatológicas da asma, como, atenuação da inflamação e do remodelamento pulmonar. O tratamento com A779 não interferiu no efeito do treinamento sobre a expressão de PGC1- α em animais asmáticos ou controles. Outro aspecto importante, não foram observadas alterações significativas na evolução do peso corporal dos animais, exceto os animais do grupo OVA-SED apresentaram redução no ganho de peso em comparação aos animais do grupo CTRL-TRE.

Na literatura alguns trabalhos indicam que o treinamento aeróbio melhora a capacidade física de pacientes e de animais em modelos experimentais de asma (Vieira e cols., 2007; Silva e cols., 2010; Mendes e cols., 2011; França- Pinto e cols., 2015). Utilizando o TEMP, observamos que os camundongos treinados controle ou asmáticos apresentaram melhora no desempenho físico. No entanto, os animais do grupo OVA-TRE-A779 ou CTRL-TRE-A779 apresentam redução do desempenho físico. Curiosamente os animais do grupo CTRL-SED apresentaram aumento no TEMP final. Não existem estudos na literatura que avaliaram o efeito do bloqueio do receptor Mas no desempenho físico. Estudos anteriores em nosso laboratório mostraram que animais com deficiência genética do receptor Mas [Mas-KO] submetidos à treinamento de natação apresentaram elevada expressão gênica de colágeno tipo I e tipo III no ventrículo esquerdo, quando comparados á animais *Wild Type* (WT) treinados (Guimarães e cols., 2012). No entanto, no estudo de Guimarães e cols. (2012) ou no presente trabalho, não foram observadas alterações durante o protocolo diário de treinamento (comunicação pessoal), sugerindo que não há impedimento quanto a realização do exercício físico de intensidade moderada mas sim, redução da capacidade máxima ou desempenho máximo ao exercício. Este resultado deve estar relacionado a alterações induzidas pelo antagonista do receptor Mas, A779 nas vias aéreas, no pulmão, na musculatura esquelética e cardíaca, entre outros. Estudos futuros deverão ser realizados para esclarecer este achado e a interferência deste em nossos resultados.

A regulação da síntese de IgE influencia de forma importante o processo inflamatório na asma. A formação do complexo antígeno/anticorpo na superfície celular dos mastócitos desencadeia uma resposta alérgica que envolve a sua degranulação e a liberação de mediadores lipídicos pró-inflamatórios, dando início ao recrutamento e ativação de células inflamatórias para as vias aéreas (Hannah e Sutton, 2008). De maneira

semelhante aos dados apresentados por Patsva e cols. (2004), o treinamento aeróbio foi capaz de impedir o aumento dos níveis plasmáticos de IgE específica à OVA em camundongos submetidos ao modelo crônico de asma. De maneira surpreendente mostramos que o tratamento com o A779 bloqueou o efeito do treinamento aeróbio sobre os níveis de IgE. De fato, os animais do grupo OVA-TRE-A779 apresentaram valores de IgE mais elevados que os animais do grupo OVA-SED. Esses dados estão de acordo com os publicados recentemente por nosso grupo (Magalhães e cols., 2015), em que se mostrou que a infusão crônica de Ang-(1-7) reduz os níveis séricos de IgE em camundongos sensibilizados e expostos à OVA. Nossos dados sugerem que a modulação negativa da síntese de IgE promovida pelo treinamento aeróbio em camundongos sensibilizados e expostos à OVA dependem da ativação do receptor Mas.

Uma das limitações do nosso estudo é o fato de não termos dosado as citocinas que participam do processo inflamatório na asma. Sabe-se que a IL-4 e IL-13 estão relacionadas com o aumento da produção de IgE, pelas células B. Evidências crescentes mostram que o treinamento aeróbio pode modular a resposta imune em modelos de inflamação pulmonar alérgica crônica, reduzindo a expressão de citocinas relacionadas a resposta Th2 e aumentando os níveis de IL-10, citocina responsável por desempenhar um papel anti-inflamatório (Vieira e cols., 2007). Outro achado interessante do nosso estudo, que poderia ser melhor elucidado pela dosagem de citocinas, refere-se ao aumento do índice de broncoconstrição observado nos animais do grupo OVA-TRE-A779. Uma vez que sabemos que a IL-13 se correlaciona com a hiperreatividade das vias aéreas e a produção de muco. Outros trabalhos não observaram diferença no índice de broncoconstrição nos animais treinados, sensibilizados e expostos à OVA, quando comparados aos animais controles sedentários ou treinados (Vieira e cols., 2007; Olivo e cols., 2012). Estudos

futuros deverão mostrar se o A779 altera o efeito modulatório do exercício físico sobre a liberação de citocinas em um modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica.

No presente estudo avaliamos a presença de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos no tecido pulmonar, através da quantificação das enzimas produzidas por esses tipos celulares. Os eosinófilos são importantes células efetoras envolvidas em doenças alérgicas. Uma vez presentes nos tecidos produzem uma variedade de mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio, gerando radicais livres e liberando grânulos tóxicos. Estes grânulos tóxicos contêm várias proteínas citotóxicas básicas, que são conhecidas como proteína básica principal, proteína eosinofílica catiônica, neurotoxina eosinofílica e Peroxidase Eosinofílica (EPO). A EPO é exclusivamente produzida por eosinófilos e por tanto é utilizada com marcador específico desse tipo celular (Erpenbeck e cols., 2003). Outro tipo celular presente na resposta inflamatória das vias aéreas é o neutrófilo. O neutrófilo possui grânulos azurófilos onde se encontra a enzima Mieloperoxidase (MPO). Esta enzima é usada com sucesso como um marcador de neutrófilos no pulmão e no miocárdio isquêmico (Cross e cols., 2003; Mullane, e cols., 1985). A N-acetilglucosaminidase (NAG) é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados (Bailey, 1988). Nossos dados mostraram que o A779 impediu a redução da infiltração de neutrófilos no pulmão de animais asmáticos que é induzida pelo treinamento físico. No entanto, o A779 não interferiu com a migração de eosinófilos, que também é reduzida pelo exercício físico. Interessantemente a migração de macrófagos não foi afetada pelo treinamento aeróbio ou pelo A779.

A presença dos diferentes tipos celulares envolvidos na asma pode ser acessada utilizando-se variadas técnicas experimentais, como ensaio de atividade enzimática, contagem diferencial de células presentes no LBA, imuno-histoquímica e citometria de fluxo. Nossos dados, através da avaliação da atividade de enzimas características de

diferentes tipos celulares, estão de acordo com os resultados obtidos por Vieira e cols (2007) e Olivo e cols. (2012). Estes autores mostraram que o treinamento aeróbio reduz o número de eosinófilos no LBA e a densidade de linfócitos e eosinófilos no tecido pulmonar, de animais submetidos a um modelo crônico de asma. A redução da densidade peribrônquica de eosinófilos e de linfócitos T, em animais alérgicos e treinados também foi observada por Silva e cols. (2010). Interessantemente, neutrófilos e eosinófilos isolados de pacientes asmáticos, quando estimulados *in vitro* com o alérgeno ao qual o paciente está sensibilizado, apresentam altos níveis de MPO e EPO, respectivamente (Monteseirín e cols., 2001; Erpenbeck e cols., 2003). Os resultados do presente estudo avançam no conhecimento mostrando que o efeito do exercício físico sobre a migração de células inflamatórias para o pulmão depende, pelo menos para neutrófilos, da ativação do receptor Mas, uma vez que, este efeito foi prevenido pelo antagonista, A779.

Estudos prévios mostraram que a deleção genética do receptor Mas, ou o seu bloqueio farmacológico com o A779, está associado a um perfil pró-inflamatório (Da Silveira e cols., 2010; EL-Hashim e cols., 2012). Por outro lado, a infusão crônica de Ang-(1-7), ou do agonista do receptor Mas, o AVE 0991, induz a atenuação de processos inflamatórios (Da Silveira e cols., 2010; Rodrigues-Machado, 2013; Magalhães e cols., 2015). A presença do receptor Mas em várias células do sistema imune fornece uma base molecular para a atuação da Ang-(1-7) (Simões e Silva e cols., 2013). Conferindo assim, um papel endógeno para o receptor Mas no controle da resposta inflamatória.

A inflamação das vias aéreas na asma é um processo multicelular que envolve eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e mastócitos, sendo a infiltração eosinofílica sua característica mais marcante (Kay, 2005). O recrutamento de leucócitos para os tecidos é um evento que ocorre de forma coordenada, e envolve a participação de inúmeras quimiocinas e moléculas de adesão celular (Simões e Silva e cols., 2013). A sensibilização

e exposição à OVA desencadeiam vários processos que resultam no recrutamento, infiltração e permanência de leucócitos no tecido pulmonar, contribuindo assim para o dano e reparação tecidual, presentes no modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica.

Nossos dados referentes ao escore histológico, através do qual avaliamos o grau de infiltração de células inflamatórias no pulmão, sugerem que o treinamento aeróbio modula negativamente o acúmulo de células inflamatórias em diferentes regiões do tecido pulmonar e que a ativação do receptor Mas é importante para esse processo. Resultados semelhantes foram obtidos por Magalhães e cols. (2015) que mostraram que a infusão crônica de Ang-(1-7) reduz o infiltrado de células inflamatórias em diferentes regiões pulmonares. Além disso, Da Silveira e cols. (2010) mostraram que a ativação do receptor Mas, através do seu agonista o AVE 0991, reduz a adesão e o rolamento de leucócitos em um modelo experimental de artrite.

Um componente chave da asma é a mudança estrutural que envolve todos os elementos das paredes das vias aéreas, o remodelamento (Holgate, 2008). O remodelamento pode ser definido como um conjunto de alterações estruturais das vias aéreas, que incluem descamação do epitélio, fibrose sub-epitelial, massa aumentada do músculo liso das vias aéreas, diminuição da distância entre as células do epitélio e o músculo liso presente nas vias aéreas, hiperplasia das glândulas mucosas, proliferação de vasos sanguíneos, edema das vias aéreas e alterações da cartilagem (Sumi e Hamid 2007).

Um achado consistente em nosso estudo foi a maior deposição de matriz extracelular nas vias aéreas, observada nos animais do grupo OVA. O treinamento aeróbio impediu a deposição de matriz extracelular nos animais do grupo OVA-TRE e este efeito benéfico foi prevenido pelo A779. Estes dados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram que, animais submetidos a um modelo crônico de asma apresentam aumento de deposição de matriz extracelular. Além disso, o remodelamento das vias aéreas pode ser atenuado, ou

até mesmo revertido, pelo treinamento aeróbio (Vieira e cols., 2007; Silva e cols., 2010; Silva e cols., 2014). Nossos dados sugerem que o efeito benéfico do treinamento aeróbio sobre a deposição de matriz extracelular nas vias aéreas está associado a ativação do receptor Mas. Consistente com os últimos achados, observamos através da técnica de Western blotting, aumento da expressão proteica de fibronectina no tecido pulmonar dos animais do grupo OVA-TRE-A779. No entanto, em nosso estudo o treinamento físico não apresentou efeito claro sobre a expressão de fibronectina, embora os valores não tenham sido diferentes do grupo controle-sedentário. Adicionalmente observamos que os animais do grupo OVA-TRE-A779 apresentaram aumento do espessamento da parede alveolar, resultante do acúmulo de células inflamatórias.

Estudos anteriores mostraram que o eixo ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas está relacionado aos efeitos benéficos do treinamento aeróbio sobre condições fisiopatológicas, como a hipertensão arterial e a insuficiência cardíaca (Gomes-Filho e cols., 2008; Kar e cols., 2010; Silva e cols., 2011; Agarwal e cols., 2011; Shah e cols., 2012). Nesses trabalhos observa-se que o treinamento aeróbio reduz a ativação do eixo clássico do SRA, e concomitantemente ativa o eixo protetor do SRA, formado por ECA2/ Ang-(1-7)/ receptor Mas. No presente estudo não observamos alteração na expressão proteica do receptor Mas, no pulmão dos camundongos dos grupos estudados.

Shan e cols. (2012), utilizando um modelo de hipertensão arterial (2K1C), mostraram que a infusão crônica de Ang-(1-7) atenuou a hipertensão e a hipertrofia cardíaca apenas em ratos treinados (natação), sendo que esse efeito não foi observado em animais sedentários. Além disso, esses autores também observaram aumento da expressão do receptor Mas e do receptor AT2 no ventrículo esquerdo desses animais. Gomes-Filho e cols. (2008) observaram aumento da expressão proteica do receptor Mas e dos níveis de Ang-(1-7) no ventrículo esquerdo de ratos SHR treinados. Além disso, Silva e cols. (2011)

observaram aumento da expressão proteica do receptor Mas na aorta de ratos SHR treinados. Nesse estudo, o treinamento aeróbio potencializou o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) nos anéis de aorta apenas dos animais treinados. Mais importante, estudos anteriores mostraram que, enquanto os níveis de Ang-(1-7) no pulmão de animais com inflamação alérgica crônica não estão alterados ou parecem reduzidos (Rodrigues-Machado e cols., 2013; Magalhães e cols., 2015), os níveis de Ang-(1-7) no plasma e tecidos aumentaram com o treinamento físico (Gomes-Filho e cols., 2008; Guimarães e cols., 2012; Cangussu, 2012-tese de doutorado). Outra limitação de nosso estudo foi não termos realizado a medida dos níveis de Ang-(1-7) na circulação e no pulmão dos animais estudados.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou pela primeira vez, que a ativação do receptor Mas pode mediar os efeitos anti-inflamatórios e anti-fibróticos induzidos pelo treinamento aeróbio em um modelo experimental de asma crônica. O bloqueio do receptor Mas nesses animais impediu a atenuação da inflamação e do remodelamento pulmonar e a redução da síntese de IgE induzida pelo treinamento aeróbio. O entendimento dos mecanismos desencadeados pelo exercício físico, especialmente a identificação de novos mediadores, pode ser de grande importância para o estabelecimento de novas estratégias farmacológicas para o tratamento de doenças inflamatórias em pacientes impossibilitados de praticar atividade física.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUNÃ MJ, PESSINA P, OLGUIN H, CABREARA D, VIO CP, BADER M, MUNOZ-CANOVES P, SANTOS RA, CABELLO-VERRUGIO C, BRANDAN E. Restoration of muscle strength in dystrophic muscle by angiotensin-1-7 through inhibition of TGF-beta signalling. *Hum Mol Genet.* 23(5): 1237-49, 2014.
- AGARWAL D, WELSCH MA, KELLER JN, FRANCIS J. Chronic exercise modulates RAS components and improves balance between pro-and anti-inflammatory cytokines in the brain of SHR. *Basic Res Cardiol.* 106(6): 1069-1085, 2011.
- BAILEY PJ. Sponge implantes as models. *Meth Immunol.* 162:327-334, 1988.
- BJORNSDOTTIR US, CYPCAR DM. Asthma: an inflammatory mediator soup. *Allergy.* 54(49):55-61, 1994.
- BOYD A, YANG CT, ESTELL K, CRAIG TUGGLE MS, GERALD LB, DRANSFIELD M, BAMMAN 3 M, BONNER J, PRESCOTT ATKINSON T, SCHWIEBERT LM. Feasibility of exercising adults with asthma: a randomized study. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 8(13), 2012.
- BRASHOLT M, BATY F, BISGAARD H. Physical activity in young children is reduced with increasing bronchial responsiveness. *J Allergy Clin Immunol.* 125: 1007-12, 2010.
- CALVO JA, DANIEL STG, PAUL A, LIN J, SPIEGELMAN BM, STEVENSON SC, RANGWALA SM. Muscle-specific expression of PPAR gamma coactivator-1 alpha improves exercise performance and increase skeletal oxygen uptake. *J Appl Physiol.* 104(5): 130-12, 2008.
- CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, DIZ DI, SANTOS RA, KHOSLA MC, BROSNIHAM KB, FERRARIO CM. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am J Physiol.* 257:H324-H329, 1989.
- CANGUSSU, LM. Alterações de componentes do sistema renina-angiotensina em áreas cerebrais de animais hipertensos submetidos a exercício físico. Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Minas Gerais. 90pp, 2012.
- CAPETTINI SA, MONTECUCCO F, MACH F, STERGIOPULOS N, SANTOS RA. Role of Renin-Angiotensin System in Inflammation, Immunity and Aging. *Curr Pharmaceut Design.* 18 (7): 963-970, 2012.
- CHAN T C, SOBEY CG, LIEU M, FERENS D, KETT MM, DIEP H, KIM HA, KRISHMAN SM, LEWIS CV, SALIMOVA E, TIPPING P, VINH A, SAMUEL CS, PETER K, GUZIK TJ, TOH B, BOBIK A, DRUMMON GR.. Obligatory Role for B cells in the Development of Angiotensin II-Dependent Hypertension. *Hypertension.* 66(5), 1023-1033, 2015.

- CONTI P, DIGIOACCHINO M. MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc.* 22(3): 133-137, 2001.
- CROSS AS, SAKARYA S, RIFAT S, HELD TK, DRYSDALE BE, GRANGE PA, CASSELS FJ, WANG LX, STAMATOS N, FARESE A, CASEY D, POWELL J, BHATTACHARJEE AK, KLEINBERG M, GOLDBLUM SE. Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. *J Biol Chem.* 278(6): 4112-4120, 2003.
- DA SILVEIRA KD, COELHO FM, VIEIRA AT, SACHS D, BARROSO LC, BADES V, SOUSA L P, SILVA TA, SANTOS RAS, SIMOES E SILVA AC, TEIXEIRA MM. Anti-inflammatory effects of the activation of the Angiotensin-(1-7) receptor Mas in a experimental model of arthritis. *J Immunol.* 185: 5569-5576, 2010.
- DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA PARA O MANEJO DA ASMA. *J Bras Pneumol.* 38 (1): 1-46, 2012.
- DUGGER KJ, CHRISMAM T, JONES B, CHASTAIN P, WATSON K, ESTELL K, SCHWIEBERT. Moderate aerobic exercise alters migration patterns of antigen specific T helper cells within an asthmatic lung. *Brain Behav Immun.* 34:67-78, 2013.
- EL-HASHIM AZ, RENNO WM, ABDUO RRHT, AKHTAR S, BENTER IF. Angiotensin-(1-7) inhibits allergic inflammation, via the Mas 1 receptor, through suppression of ERK $\frac{1}{2}$ and NFK-B-depended pathways. *Brit J Pharmacol.* 166: 1964–1976, 2012.
- ERPENBECK VJ, HOHLFELD J M, PETSCHALLIES J, EKLUND E, PETERSON CGB, FABET H, KRUNG N. Local release of eosinophil peroxidase following segmental allergen provocation asthma. *Clin Exp Allergy.* 33: 331-336, 2003.
- FRANÇA-PINTO A, MENDES FA, DE CARVALHO-PINTO RM, AGONDI RC, CUKIER A, STELMACH R, SARAIVA-ROMANHOLO BM, KALIL J, MARTINS MA, GIAVINA-BIANCHI P, CARVALHO CR. Aerobic training decrease bronchial hyperresponsiveness and systemic inflammation in patients with moderate or severe asthma: a randomised controlled trial. *Thorax.* 70(8):732-739, 2015.
- GLEESON M, BISHOP NC, STENSEL DJ, LINDLEY MR, MASTANA SS, NIMMO MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol.* 11(9): 607-615, 2011.
- GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA-GINA. Pocket Guide for Asthma Management and Prevention. 1-32, 2012.
- GOMES-FILHO A, FERREIRA AJ, SANTOS SHS, NEVES SRS, CAMARGO ERS, BECKER LK, BELCHIOR HÁ, DIAS-PEIXOTO MF. PINHEIRO SVB, SANTOS RAS. Selective increase of angiotensin (1-7) and its receptor in hearts of spontaneously hypertensive rats subjected to physical training. *Exp Physiol.* 93 (5):589-598, 2008.
- GUIMARÃES GG, SANTOS SH, OLIVEIRA ML, PIMENTA-VELLOSO EP, MOTTA DF, MARTINS AS, ALENINA N, BADER M, SANTOS RA, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ. Exercise induces renin-angiotensin system unbalance and high collagen expression In the heart of Mas-deficient mice. *Peptides* 38(1): 54-61, 2012.

- HANNAH JG, SUTTON BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol.* 8(3): 205-217, 2008.
- HEWITT M, CREEL A, ESTELL K, DAVIS IC, SCHWIEBERT LM. Acute exercise decrease airway inflammation, but not responsiveness, in an allergic asthma model. *Am J Respir Cell Mol.* 40(1) 83-89, 2008.
- HEWITT M, ESTELL K, DAVIS IC, SCHWIEBERT LM. Repeated Bouts of moderate-intensity aerobic exercise reduce airway reactivity in a murine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 42: 243-249, 2010.
- HOLGATE ST, DAVIES DE, PUDDICOMBE S, RICHTER A, LACKIE P, LORDAN J, HOWART P. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *Allergol Int.* 52:45-52. 2003.
- HOLGATE ST. Pathogenesis of Asthma. *Clin Exp Allergy* 38: 872–897, 2008.
- KAR S, GAO L, ZUCKER IH. Exercise training normalizes ACE and ACE2 in the brain of rabbits with pacing-induced heart failure. *J Appl Physiol.* 108: 923-932, 2010.
- KAY AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med.* 11(4): 148-152, 2005.
- KUDO M, ISHIGATSUBO Y, AOKI I. Pathology of asthma. *Front Microbiol.* 10(4): 263, 2013.
- LAUTNER RQ, VILLELA DC, FRAGA-SILVA RA, SILVA N, VERANO-BRAGA T, COSTA-FRAGA F, JANKOWSKI J, JANKOWSKI V, SOUSA F, ALZAMORA A, ET AL. Discovery and Characterization of Alamandine: A Novel Component of the Renin-Angiotensin System. *Circ Res.*112:1104-1111, 2013.
- LEANDRO CG, Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em resposta ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte.* 13(5):343-348, 2007.
- LUKS V, BURKETT A, TUMER L, PAKHALE S. Effects of physical training on airway inflammation in animal models of asthma: a systematic review. *BMC Pulm Med* (24): 13-24, 2013.
- MAGAHÃES GS, RODRIGUES-MACHADO MG, MOTTA-SANTOS D, SILVA AR, CALIARI MV, PRATA LO, ABREU SC, ROCCO PR, BARCELOS LS, SANTOS RA, CAMPAGNOLE- SANTOS MJ. Angiotensin-(1-7) attenuates airway remodeling and hyperresponsiveness in a model of chronic allergic lung inflammation. *Br J Pharmacol.* 172(9): 2330-2342, 2015.
- MATEO T, NABAH YNA, TAHA MA, MATA M, NICOLAS-CERDÁ M, PROUDFOOT AEI, STAHL RAK, ISSEKUTZ ACI, CORTIJO J, MORCILO EJ, JOSE PJ, SANZ MJ. Angiotensin II- induced mononuclear leukocyte interactions with arteriolar and venular endothelium are mediated by the release of different chemokines. *J Immunol.*176:5577-5586, 2006.
- MAUAD T. Remodelamento brônquico na asma. *J. Pneumol.* 26(2):91-98, 2000.

- MENDES FAR, ALMEIDA FM, CUKIER A, STELMACH R, JACOB-FILHO W, MARTINS MA, CARVALHO CRF. Effects of aerobic training on airway inflammation in asthmatic patients. *Med Sci Sports Exerc.* 43(2):197-203, 2010.
- MILLAR E, NALLY J E, THOMSON N C. Angiotensin II potentiates methacholine-induced bronchoconstriction in human airway both in- vitro and in vivo. *Eur Respir J.* 8 (11): 1838-1841, 1995.
- MILLAR EA, ANGUS RM, HULKS G, MORTON JJ, CONELL JMC, THOMSON NC. Activity of the renin-angiotensin system in acute severe asthma and effect of angiotensin II on lung function. *Thorax.* 49 (5) 492-495, 1994.
- MONTESEIRÍN J, BONILLA I, CAMACGO MJ, CONDE J, SOBRINO F. IgE-dependent release of myeloperoxidase by neutrophils from allergic patients. *Clin Exp Allergy.* 31:889-892, 2001.
- MULLANE KM, KRAEMER R, SMITH B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Meth.* 74: 157-167, 1985.
- MYOU S, FUJIMURA M, KAMIO Y, ISHIRA Y, KURASHIMA K, TACHIBANA H et al. Effect of losartan, a type 1 angiotensin II receptor antagonist, on bronchial hyperresponsiveness to methacholine in patients with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 162: 40-44, 2000.
- OLIVO CR, VIEIRA RP, ARANTES-COSTA FM, PERINI A, MARTINS MA, CARVALHO CR. Effects of aerobic exercise on chronic allergic airway inflammation and remodeling in guinea pigs. *Respir Physiol Neurobiol.* 182(2-3):81-87, 2012.
- PAKHALE S, LUKS V, BURKETT A, TURNER L. Effect of physical training on airway inflammation in bronchial asthma: a systematic review. *BMC Pulm Med.* 13 (38):3-10, 2013.
- PASSOS-SILVA D G, VERANO-BRAGA T, SANTOS R A. Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. *Clin Sci (Lond).* 124 (7): 443-456, 2013.
- PASTVA A, ESTELL K, SCHOEB TR, ATKINSON TP, SCHWIEBERT LM. Atopic asthma inflammatory responses in a mouse model of aerobic exercise attenuates airway. *J Immunol.* 172: 4520-4526, 2004.
- PAUL M, MERHR AP, KREUTZ R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 86:747-803, 2006.
- PEDERSEN AMW, PEDERSEN BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol.* 98(4): 1154-1162, 2005.
- PELAIA G, VATRELLA A, BUSCETI MT, GALLELLI L, CALABRESE C, TERRACCIANO R, MASELLI R. Cellular mechanisms Underlying Eosinophilic and Neutrophilic Airway Inflammation in Asthma. *Mediators Inflamm.* 2015:879783, 2015.

- PEREIRA RM, SANTOS RAS, TEIXEIRA MM, LEITE VHR, COSTA LP, DIAS FLC, BARCELOS LS, COLLARES GB, SIMOES E SILVA AC. The renin-angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: Evidence for a protective role of Angiotensin-(1-7). *J Hepatol.* 46:674-681, 2007.
- RODRIGUES-MACHADO MG, MAGALHÃES GS, CARDOSO JA, KANGUSU LM, MURARI A, CALIARI MV. AVE 0991, a Nonpeptide Mimic of Angiotensin-(1-7) Effects, Attenuates Pulmonary Remodeling in a model of Chronic Asthma. *Br J Pharmacol.* 170(4): 835-846, 2013.
- RUIZ-ORTEGA M. LORENZO O, SUZUJI Y, RUPEREZ M, EGIDO J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens*,10 (3):321-9, 2001.
- RUSSELL AP, FEILCHENFELDT J, SCHREIBER S, PRAZ M, CRETENAND A, GOBELET C, MEIER CA, BELL DR, KRALLI A, GIACOBINO P, DE RIAZ O. Endurance Training in Humans Leads to Fiber Typ Specific Increases in Levels of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator-1 and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- in Skeletal Muscle. *Diabetes* 52: 2874-2881, 2003.
- SAKAI H, NISHIZAWA YUKO, NISHIMURA A, CHIBA Y, GOTO K, HANAZAKI M. Angiotensin II induces hyperresponsiveness of bronchial smooth muscle via an activation of p42/44 ERK in rats. *J Physiol.* 460 (3): 645-655, 2010.
- SAMPAIO WO, SANTOS RAS, FARIA-SILVA R, MACHADO LTM, SCHIFFRIN EL, TOUYZ RM. Angiotensin-(1-7) Through Receptor Mas Mediates Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation via Akt-Dependent Pathways. *Hypertension.* 49(1): 185-92. 2007.
- SANTOS RAS, FAGUNDES-MOURA CR, SIMÕES E SILVA AC. Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renin-angiotensina. *Rev Bras Hipertensão* 3: 227-36, 2000.
- SANTOS RAS, FERREIRA AJ. SILVA ACS. Recentes advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol.* 93(5):519-27, 2008.
- SANTOS RAS, SIMOES E SILVA AC, MARIC C, SILVA DMR, MACHADO RP, BUHR I, HERINGER-WALTHER S, PINHEIRO SVB, LOPES MT, BADER M, MENDES EP, LEMOS VS, CAMPAGNOLE SANTOS MJ, SCHULTHEISS H, SPETH R, WALTHER T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:8258-8263, 2003.
- SCHIAVONE MT, SANTOS RA, BROSNIHAN KB, KHOSLA MC, FERRARIO CM. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 4095-4098, 1988.
- SHAN A, OH YB, LEE SH, LJM, KIM SH. Angiotensin-(1-7) attenuates hypertension in exercise-trained renal hypertensive rats. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol.* 302: 2372-2380, 2012.

- SILVA DMR, GOMES-FILHO A, OLIVON VC, SANTOS TMS, BECKER LK, SANTOS RAS, LEMOS VS. Swimming training improves the vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in the aorta of spontaneously hypertensive rat. *Appl Physiol.* 111: 1272-1277, 2011.
- SILVA RA, VIEIRA RP, DUARTE ACS, LOPES FDTQS, PERINI A, MAUAS T, MARTINS MA, CARVALHO CRF. Aerobic training reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. *Eur. Respir. J.* 35: 994-1002, 2010.
- SIMÕES E SILVA AC, SILVEIRA KD, FERREIRA AJ, TEIXEIRA MM. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Brit J Pharmacol.* 163(3): 477-492, 2013.
- HOLGATE ST. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int.* 57: 1-10, 2008.
- SUMI Y, HAMID Q. Airway remodeling in asthma. *Allergol Int.* 56(4): 341-348, 2007.
- TAN RA, SPECTOR SL. Exercise-induced asthma. *Sports Med.* 25(1): 1-6, 1998.
- VIEIRA RP, CLAUDINO RC, DUARTE ACS, SANTOS ABG, PERINI A, FARIA-NETO HCC, MAUAD T, MARTINS MA, DOLHNIKOFF M, CARVALHO CRF. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 176: 871-877, 2007.