

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

NICOLE CRISTINE RIGONATO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA IL-10 NOS EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS
DO EXERCÍCIO AERÓBIO NA SÍNDROME DO DESCONFORTO
RESPIRATÓRIO AGUDO EXPERIMENTAL**

SÃO PAULO

2014

NICOLE CRISTINE RIGONATO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA INTERLEUCINA-10 NOS EFEITOS ANTI-
INFLAMATÓRIOS DO EXERCÍCIO AERÓBIO NA SÍNDROME DO
DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada à Universidade
Nove de Julho, para obtenção do título
de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira

Co-orientadora: Prof^a Dra. Regiane Albertini de Carvalho

SÃO PAULO, SP

2014

Rigonato-Oliveira, Nicole Cristine.

Avaliação do papel da interleucina-10 nos efeitos anti-inflamatórios do exercício aeróbio na síndrome do desconforto respiratório agudo experimental. / Nicole Cristine Rigonato de Oliveira. 2014.

81 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2014.

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

I. Exercício aeróbio. 2. Síndrome do desconforto respiratório agudo. 3. Interleucina-10. 4. Receptor toll like 4. 5. Receptor toll like 7. I. Vieira, Rodolfo de Paula. II. Título

CDU 615.8

São Paulo, 19 de dezembro de 2014.

TERMO DE APROVAÇÃO


Aluno(a): NICOLE CRISTINE RIGONATO DE OLIVEIRA

Título da Dissertação: "Avaliação do papel da IL10 nos efeitos anti-inflamatórios do exercício aeróbio na síndrome do desconforto respiratório agudo experimental"

Presidente: PROF. DR. RODOLFO DE PAULA VIEIRA



Membro PROFA. DRA. BEATRIZ MANGUEIRA SARAIVA



Membro: PROF. DR. LUIS VICENTE FRANCO DE OLIVEIRA



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe **Helena**, minha irmã **Ana Carolina** e ao meu amado e companheiro **Diego**, pela confiança em que sempre tiveram em mim e por terem me apoiado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Esse é mais um momento de vitória em minha vida e tenho certeza de que somente foi possível com o apoio de pessoas especiais que se fizeram presente fisicamente ou espiritualmente nessa etapa.

Primeiramente a Deus, que permitiu essa oportunidade maravilhosa em minha vida, repleta de novos conhecimentos e momentos abençoados.

Agradeço aos meus avós Sebastião Rigonato e Etelvina Rigonato (em memória) por todos os ensinamentos e confiança que sempre tiveram enquanto presentes.

À minha querida e amada mãe Helena Rigonato, que perante a todas as dificuldades enfrentadas até o presente momento, jamais deixou de me transmitir conhecimentos, confiança e esperança de dias melhores. Em especial nesses últimos dois anos, mesmo estando distante, sempre me apoiou, lutou e sofreu junto comigo.

À minha querida e amada irmã Ana Carolina Aparecida Rigonato de Oliveira, pela confiança, apoio, palavras de sabedoria e conselhos.

Ao meu companheiro e namorado Diego do Nascimento, que jamais permitiu que eu me abalasse ou desanimasse diante de todas as dificuldades.

A todos os meus demais familiares e amigos que me acompanharam à distância nessa caminhada.

Aos meus queridos professores, que anteriormente me encorajaram a iniciar essa nova etapa em minha vida profissional, esta que hoje chega ao final, em especial ao Nelson Serrão Francisco Júnior, Aline Roberta Danaga e Sandra Vieira Domingues.

Aos meus professores, em especial ao Rodolfo de Paula Vieira e Ana Paula Ligeiro de Oliveira, por terem me acolhido em seu laboratório e terem compartilhado comigo novos conhecimentos e por terem auxiliado em meu crescimento profissional e pessoal.

À professora e minha co-orientadora Regiane Albertini de Carvalho, pela confiança e auxílios.

Ao meu grupo de laboratório de imunologia pulmonar e exercício, em especial aos novos e eternos amigos Vanessa Rosa da Silva, Flávia Regina Greiffo, Auriléia Aparecida de Brito, Adilson Santos Andrade de Sousa e Paulo Rogério Pereira.

Às técnicas de laboratório, Ângela, Luciana e Samara, que sempre se dispuseram a ensinar e ajudar.

Ao bioterista Rodrigo, por colaborar com a manutenção dos animais.

Aos alunos e professores do laboratório de pesquisa, que sempre compartilharam seus conhecimentos, que puderam contribuir de forma direta ou indiretamente, de maneira positiva a complementar meu crescimento profissional, em especial aos alunos Danielle da Silva Dias, Janaina de Oliveira Brito e Yves Silva Teles Matos.

À UNINOVE pela concessão da bolsa de estudo.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é uma doença caracterizada pela insuficiência respiratória decorrente a uma resposta inflamatória, que apresenta alta morbi-mortalidade. Diversas citocinas parecem orquestrar os processos agudo e crônico, mediados principalmente por receptores *toll like* (TLRs). A literatura demonstra que o exercício aeróbio (EA) é capaz de diminuir a secreção de citocinas pró-inflamatórias nos pulmões, mediado pelo aumento da liberação de interleucina 10 (IL-10), além de o EA modular a expressão de TLRs e enzimas antioxidantes. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar se os efeitos anti-inflamatórios do EA em modelo experimental da SDRA intra e extrapulmonar são mediados por IL-10. Para isso, os animais foram submetidos ao treinamento físico em esteira, de intensidade moderada, durante 4 semanas. Após 24 horas ao último teste físico, os animais receberam LPS por via intra-traqueal (it) (10ug/animal) ou por via intra-peritoneal (ip) (100ug/animal). Após 24 horas, os animais foram avaliados para o número de células e de citocinas pró e anti-inflamatórias no fluído do lavado broncoalveolar (LBA) e no soro, número de neutrófilos no parênquima pulmonar e expressão do TLR4, TLR7, SOD, ânion e QL nos homogenatos de pulmão. EA reduziu a acumulação de neutrófilos no parênquima pulmonar, tanto LPS it e LPS ip ($p < 0,01$) e no LBA ($p < 0,01$). EA atenuou os níveis de citocinas pró-inflamatórias no LBA e soro ($p < 0,05$), avaliada por ELISA. EA teve os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 aumentados no soro e LBA ($p < 0,05$). EA também reduziu a expressão de TLR4 nos homogenatos de pulmão ($p < 0,05$) e aumentou a expressão de TLR7 no grupo de LPS + EA avaliada por western blotting ($p < 0,05$). Os resultados para a enzima antioxidante SOD apresentou aumento significativo nos grupos submetidos ao EA. Conclui-se que EA reduziu o impacto de SDRA induzida por LPS, independente da etiologia e tais efeitos parecem estar mediados pela modulação do EA na secreção de citocinas anti-inflamatórias, principalmente da IL-10, na modulação de TLR4 e TLR7 e no aumento da expressão de SOD ($p < 0,05$).

Palavras-chave: Exercício aeróbio. Síndrome do desconforto respiratório agudo. Interleucina-10. Receptor *toll like* 4, Receptor *toll like* 7. SOD.

ABSTRACT

The acute respiratory distress syndrome (ARDS) is a disease characterized by respiratory failure due to an inflammatory response, which has high morbidity and mortality. Several cytokines seem to orchestrate the acute and chronic processes, mainly mediated by toll like receptors (TLRs). The literature demonstrates that aerobic exercise (AE) is capable of decreasing the secretion of pro-inflammatory cytokines in the lungs mediated increased release of interleukin 10 (IL-10), and AE modulate expression of TLRs and antioxidant enzymes. The objective of this study was to evaluate whether the anti-inflammatory effects of AE in an experimental model of intra and extrapulmonary ARDS are mediated by IL-10. For this, the animals were subjected to physical training on a treadmill, moderate for 4 weeks. 24 hours after the last physical test, animals received LPS by intratracheally (it) (10ug / animal) or intraperitoneally (ip) (100ug / animal). After 24 hours, the animals were assessed for the number of cells and pro- and anti-inflammatory cytokines in bronchoalveolar lavage fluid (BAL) and serum were the number of neutrophils in the lung parenchyma and expression of TLR4, TLR7, SOD, α -nion and QL in lung homogenates. AE reduced accumulation of neutrophils in the lung parenchyma, so it LPS and LPS ip ($p < 0.01$) and BAL ($p < 0.01$). AE attenuate the levels of proinflammatory cytokines in BAL and serum ($p < 0.05$), as measured by ELISA. AE had levels of anti-inflammatory cytokine IL-10 increased in the serum and BAL ($p < 0.05$). AE also reduced the expression of TLR4 in lung homogenates ($p < 0.05$) and increased the expression of TLR7 in group LPS + AE evaluated by western blotting ($p < 0.05$). The results for the antioxidant enzyme SOD showed a significant increase in the groups submitted to AE. It follows that the impact of reduced LPS-induced ARDS, regardless of etiology, and these effects appear to be mediated by modulation of the AE secretion of anti-inflammatory cytokines, especially IL-10, modulating TLR4 and TLR7 and increased expression of SOD ($p < 0.05$).

Keywords: Aerobic exercise. Acute respiratory distress syndrome. Interleukin-10. Toll like receptor 4, Toll like receptor 7. SOD.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ii
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	19
1.1. Lesão do epitélio alveolar na lesão pulmonar aguda.....	20
1.2. Reparo do epitélio alveolar na lesão pulmonar aguda	23
1.3. SDRA e mediadores Inflamatórios	24
1.4 Receptores Toll Like (TLRs) e SDRA.....	27
1.5.Estresse oxidativo e SDRA	27
1.6. Exercício aeróbio (EA) e Sistema Imune.....	29
1.7. Exercício aeróbio (EA) e Doenças Pulmonares.....	30
1.8. Exercício Aeróbio (EA) e SDRA	32
1.8. Justificativa	34
2. OBJETIVOS.....	35
2.1. Objetivos Gerais.....	35
2.2. Objetivos Específicos	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1. Comitê de ética.....	36
3.2. Animais	36
3.3. Grupos experimentais	36
3.3.1. <i>Experimento em animais C57Bl</i>	36
3.4. Protocolo experimental	37
3.5. Modelo de Exercício aeróbio de intensidade moderada	38

3.6. Modelo de SDRA intrapulmonar e extrapulmonar.....	38
3.7. Eutanásia dos animais.....	39
3.8. Coleta do sangue e análise do soro sanguíneo	39
3.9. Avaliação da inflamação pulmonar no lavado broncoalveolar (LBA)	40
3.10. Análise quantitativa de neutrófilos no parênquima pulmonar	40
3.11. Avaliação dos níveis de citocinas no lavado broncoalveolar (LBA) e no soro por ELISA.....	41
3.12. Avaliação da expressão de TLRs nas proteínas dos pulmões	42
3.13. Avaliação do perfil de estresse oxidativo	43
3.13.1. Quimioluminescência (QL).....	44
3.13.2. Enzima antioxidante – Superóxido Dismutase (SOD)	44
3.13.3. Ânion superóxido	45
3.14. Análise estatística.....	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Teste de treinamento físico aeróbio em esteira	46
4.2. Contagem de células totais no sangue	46
4.3. Contagem de células totais e diferenciais no LBA	46
4.4. Avaliação da inflamação pulmonar no LBA.....	47
4.5. Análise quantitativa de neutrófilos no parênquima pulmonar	48
4.6. Avaliação dos níveis de citocinas no LBA por ELISA.....	49
4.7. Avaliação dos níveis de citocinas no soro por ELISA	55
4.8. Avaliação do nível da citocina IL-10 no LBA e soro por ELISA	60
4.9. Avaliação da expressão de TLR 4 nas proteínas dos pulmões	61

4.10. Avaliação da expressão de TLR 7 nas proteínas dos pulmões	62
4.11. Avaliação da expressão de SOD nas proteínas dos pulmões.....	63
4.12. Avaliação da expressão de Ânion nas proteínas dos pulmões	64
4.13. Avaliação da expressão de QL nas proteínas dos pulmões	65
5.DISSCUSSÃO	66
6. CONCLUSÃO	71
7. ANEXOS	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Papel de neutrófilos na SDRA	22
Figura 2. Demonstração do Exercício Aeróbio de moderada intensidade	38
Figura 3. Demonstração do modelo de SDRA Intrapulmonar (a) e modelo de SDRA Extrapulmonar (b)	39
Figura 4. Acumulação de neutrófilos no lavado broncoalveolar	47
Figura 5. Densidade neutrofílica no parênquima pulmonar	48
Figura 6. Efeitos do EA sobre o nível da citocina IL-1 β no LBA	49
Figura 7. Efeitos do EA sobre o nível da citocina IL-6 no LBA	50
Figura 8. Efeitos do EA sobre o nível da citocina CXCL1/KC β no LBA....	51
Figura 9. Efeitos do EA sobre o nível da citocina IL-17 no LBA	52
Figura 10. Efeitos do EA sobre o nível da citocina IFN- γ no LBA.....	53
Figura 11. Efeitos do EA sobre o nível da citocina TNF- α no LBA	54
Figura 12. Efeitos do EA sobre o nível da citocina IL-1 β no soro.....	55
Figura 13. Efeitos do EA sobre o nível da citocina IL-6 no soro	56
Figura 14. Efeitos do EA sobre o nível da citocina CXCL1/KC β no soro .	57
Figura 15. Efeitos do EA sobre o nível da citocina IFN- γ no soro	58
Figura 16. Efeitos do EA sobre o nível da citocina TNF- α no soro	59
Figura 17. Efeitos do EA sobre o nível da citocina IL-10	60
Figura 18. Efeitos do EA sobre a densidade relativa de TLR4 no homogenato de pulmão.....	61
Figura 19. Efeitos do EA sobre a densidade relativa de TLR7 no homogenato de pulmão.....	62

Figura 20. Efeitos do EA sobre a densidade relativa de SOD no homogenato de pulmão	63
Figura 21. Efeitos do EA sobre a densidade relativa de Ânion no homogenato de pulmão	64
Figura 22. Efeitos do EA sobre a densidade relativa de QL no homogenato de pulmão	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – graus celsius

AE – do inglês, *aerobic exercise*

Ac - anticorpo

ARDS – do inglês, *acute respiratory distress syndrome*

BAL – do inglês, *bronchoalveolar lavage*

BCA - ácido bicinchonínico

CCL2 – quimiocina C-C-Motif ligante 2

CCL7 – quimiocina C-C-Motif ligante 7

CD - células dendríticas

CD 3+ – grupo de diferenciação 3+

CD 4+ – grupo de diferenciação 4+

CD 14 – grupo de diferenciação 14

CEUA- comitê de ética e pesquisa no uso de animais

Co - controle

CXCL1/KC – quimiocina (C-X-C Motif) ligante 1/KC

CXCL10 - quimiocina (C-X-C Motif) ligante 10

DP – desvio padrão

EA – exercício aeróbio

ELISA - do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*

EA+LPS it - exercício aeróbio + LPS intratraqueal

EA+LPS ip - exercício aeróbio + LPS intraperitoneal

E. Coli - escherichia coli

G-CSF – fator estimulador de colônias de granulócitos

GPX - glutathione peroxidase

IFN-γ – interferon γ

IgE – imunoglobulina E

IgG – imunoglobulina G

IL-1 β – interleucina 1 β

IL-1ra - antagonista de receptor da interleucina 1

IL-4 – interleucina 4

IL-5 – interleucina 5

IL-6 – interleucina 6

IL-8 – interleucina 8

IL-10 - interleucina 10

IL-13 – interleucina 13

IL-17 – interleucina 17

it – intra-traqueal

ip – intra-peritoneal

km/h - kilometro/hora

LBA – lavado broncoalveolar

LBP – proteína ligante

LPA – lesão pulmonar aguda

LPS – lipopolissacarídeo

LPS ip – lipopolissacarídeo intraperitoneal

LPS it – lipopolissacarídeo intratraqueal

MCP-1- proteína quimiotáctica de monócitos 1

MD 2 – fator de diferenciação mielóide 2

mg/kg – miligrama/kilograma

ml – mililitro

mm Hg – milímetro de mercúrio

MPO - mieloperoxidase

NaCl – cloreto de sódio

NF- κ B - fator de transcrição nuclear

nm - nanômetro

OVA - ovalbumina

PAF – fator de agregação plaquetária

PAMPs - padrões moleculares associados à patógenos

Pa O₂ / F IO₂ – pressão arterial de oxigênio/ fração inspirada de oxigênio

PBS – tampão fosfato salino

PEEP – do inglês, *positive end-expiratory pressure*

PLA2 – fosfolipase A2

PMN – polimorfonucleares

QL- Quimioluminescência

rpm – rotações por minuto

SDRA – síndrome do desconforto respiratório agudo

SAv-HRP - estreptavidina peroxidase

SOD – superóxido dismutase

SOD 2 – superóxido dismutase 2

TF – fator tecidual

Th1 - T helper tipo 1

Th2 - T helper tipo 2

Th17 - T helper tipo 17

TMB - tetrametilbenzedina

TLR 4 – receptor de toll like 4

TLR 7 – receptor de toll like 7

TLRs – receptores de toll like

TNF-α – fator de necrose tumoral α

Toll-IL-1 - homólogo ao receptor para IL-1

ug – micrograma

um – micrômetro

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e lesão pulmonar aguda (LPA) são complicações respiratórias que ameaçam a vida, causando insuficiência respiratória grave. LPA é o termo utilizado para descrever a resposta pulmonar a uma ampla gama de lesões que ocorram, quer diretamente para o pulmão ou como uma consequência de lesão ou inflamação em outros locais do corpo. SDRA representa a extremidade mais grave do espectro desta condição e está associada a uma taxa de morbi-mortalidade elevada, variando entre 30% e 60% (SINGH et al., 2014). Em decorrência a alta mortalidade e variabilidade substancial nos resultados em pacientes com SDRA, a identificação de fatores de risco para mortalidade são importantes para determinar o prognóstico e orientar a tomada de decisão clínica (SINGH et al., 2014).

A SDRA é o termo utilizado para definir a insuficiência respiratória decorrente a resposta inflamatória que evolui com alteração da permeabilidade alvéolo-capilar, edema pulmonar e hipoxemia refratária aos altos fluxos de oxigênio (MATUTE-BELLO et al., 2008; MATUTE-BELLO et al., 2011; RANIERI, 2012; WILLIAMS; CHAMBRES, 2014).

As causas da SDRA podem ser de origens diretas ou indiretas. As principais causas diretas são: pneumonia, aspiração do conteúdo gástrico, contusão pulmonar e inalação de substâncias tóxicas. Já as causas indiretas são apontadas como: sepse grave, transfusão de sangue, trauma, circulação extracorpórea e pancreatite (WALKEY et al., 2012, REISS; UHLIG; UHLIG, 2012).

O início da SDRA se dá pelo período inferior a sete dias do dano clínico predisponente, com presença de anormalidades radiográficas, evidenciando opacidades bilaterais. A oxigenação apresenta valores críticos de PaO_2 / FiO_2 e relação de pressão positiva no final da expiração (PEEP) com ≥ 5 cm H_2O (RANIERI, 2012, WALKEY et al., 2012).

Um projeto definiu 3 categorias mutuamente exclusivas de SDRA, baseado no grau de hipoxemia, de acordo com os valores da relação de PaO_2 / FiO_2 : leve ($200 \text{ mm Hg} \leq 300 \text{ mm Hg}$), moderada ($100 \text{ mm Hg} \leq 200 \text{ mm Hg}$) e grave ($\leq 100 \text{ mm Hg}$) e 4 variáveis auxiliares para SDRA grave: gravidade radiográfica, complacência do sistema respiratório ($\leq 40 \text{ mL/cm H}_2O$), PEEP

(≥ 10 cm H₂O), e corrigidos volume expirado por minuto (≥ 10 L / min) (RANIERI, 2012; WALKEY et al., 2012).

Estudos têm mostrado que as taxas de SDRA leves (PAO₂ / FiO₂ 200-300) representam apenas 25% dos pacientes com SDRA, com aproximadamente 75% dos pacientes com SDRA moderadas ou graves (RANDHAWA, R.; BELLIGAN, G., 2007; RANIERI, 2012).

A evolução dos pacientes portadores da SDRA é muito variável e influenciada por diversos fatores. A extensão da lesão da barreira epitélio alveolar, é um dos mecanismos mais importantes que determina o grau de severidade desta injúria pulmonar (GEISER, 2003). Tipicamente, a SDRA tem sido estereotipada como uma resposta para a injúria pulmonar com transição de dano alveolar capilar, para a fase proliferativa independente da etiologia inicial (SANTOS et al., 2006).

Evidências específicas decorrentes ao insulto primário, podem determinar que diferentes causas de SDRA irão resultar em uma patologia parcialmente uniforme. Desta maneira, duas formas de SDRA têm sido descritas:

SDRA com efeitos diretos nas células epiteliais pulmonares;

SDRA refletindo um envolvimento pulmonar secundário para uma resposta inflamatória sistêmica, apresentando como centro da injúria, a célula endotelial pulmonar.

Dessa forma, tem sido reconhecido que as respostas a SDRA intra e extrapulmonar apresentam determinadas particularidades e a relação entre a inflamação local e a inflamação subsequente ainda é pouco conhecida. A mediação destas respostas ocorre por agentes agressores, que induzem a uma produção de mediadores pró-inflamatórios teciduais, resultando numa crescente inflamação (GEISER, 2003; BROWNE; PITCHUMONI, 2006; MATUTE-BELLO et al., 2008; MATUTE-BELLO et al., 2011; RANIERI, 2012).

1.1. Lesão do epitélio alveolar na lesão pulmonar aguda

A barreira alveolar normal é composta de três diferentes estruturas: o endotélio capilar, o espaço intersticial incluindo a membrana basal e a matriz

extracelular e o epitélio alveolar. O epitélio alveolar consiste de células alveolares tipo I e II. A superfície de células tipo I engloba cerca de 90 % da área alveolar. O delgado citoplasma provê por aproximação do lúmen alveolar e fluxo sanguíneo, a otimização da troca dos gases respiratórios. As células cubóides alveolares tipo II são células multifuncionais (GEISER, 2003).

Elas produzem surfactante, são importantes para ativar *clearence* do líquido alveolar e representam as células progenitoras que regeneram o epitélio alveolar após a injúria. Em condições anormais, a barreira epitelial é muito menos permeável que a barreira endotelial e impede a passagem de células e plasma para o espaço aerado devido à manutenção normal das trocas (GEISER, 2003).

A lesão alveolar difusa é uma marca dos pacientes com SDRA, mesmo a lesão sendo causada diretamente ou ainda, quando causada indiretamente (SANTOS et al., 2006; BROWNE; PITCHUMONI, 2006). Em estudos histológicos de tecidos pulmonares provenientes de pacientes com SDRA, a primeira lesão aparece como edema intersticial seguido por lesão severa do epitélio alveolar. O epitélio alveolar usualmente exibe extensiva necrose das células alveolares tipo I deixando uma erosão, porém, mantendo a membrana basal recoberta com membranas hialinas. A célula epitelial tipo I é altamente vulnerável a lesões, entretanto, a tipo II é a célula mais resistente e pode funcionar como progenitora celular para regeneração do epitélio após a lesão.

A perda da integridade do epitélio alveolar gera consequências funcionais e patológicas severas, como por exemplo: existe um influxo de proteínas e edema para o espaço aéreo com deposição de membrana hialina na membrana basal lesada, hiperplasia da célula alveolar tipo II típica da fase proliferativa da SDRA, células alveolares tipo II migrando e iniciando a proliferação ao longo do septo alveolar na tentativa de recobrir a membrana basal lesada e restabelecer a continuidade do epitélio alveolar, dentro da parede alveolar, fibroblastos proliferam e migram através da membrana basal através do exsudato fibroso intra-alveolar.

Se o exsudato fibroso pode resolver esse processo lesivo, a restauração da arquitetura normal do pulmão pode ser alcançada. Entretanto, se a célula alveolar tipo II migrar sobre a superfície da organização tecidual granular, ocorre uma transformação de exsudato intra-alveolar para tecido intersticial, e a fibrose intersticial do pulmão pode se desenvolver (GEISER, 2003; BROWNE;

PITCHUMONI, 2006; MATUTE-BELLO et al., 2008; MATUTE-BELLO et al., 2011; RANIERI, 2012).

Uma característica fundamental da SDRA é o acúmulo de neutrófilos na microvasculatura pulmonar, interstício e no espaço alveolar, e que normalmente está presente na fase inicial da SDRA (WILLIAMS; CHAMBERS, 2014).

A principal função de neutrófilos é proporcionar a defesa do hospedeiro imediata contra microorganismos patogênicos. Neutrófilos liberam vários fatores antimicrobianos, tais como espécies reativas de oxigênio, proteases e armadilhas extracelulares dos neutrófilos (WILLIAMS; CHAMBERS, 2014).

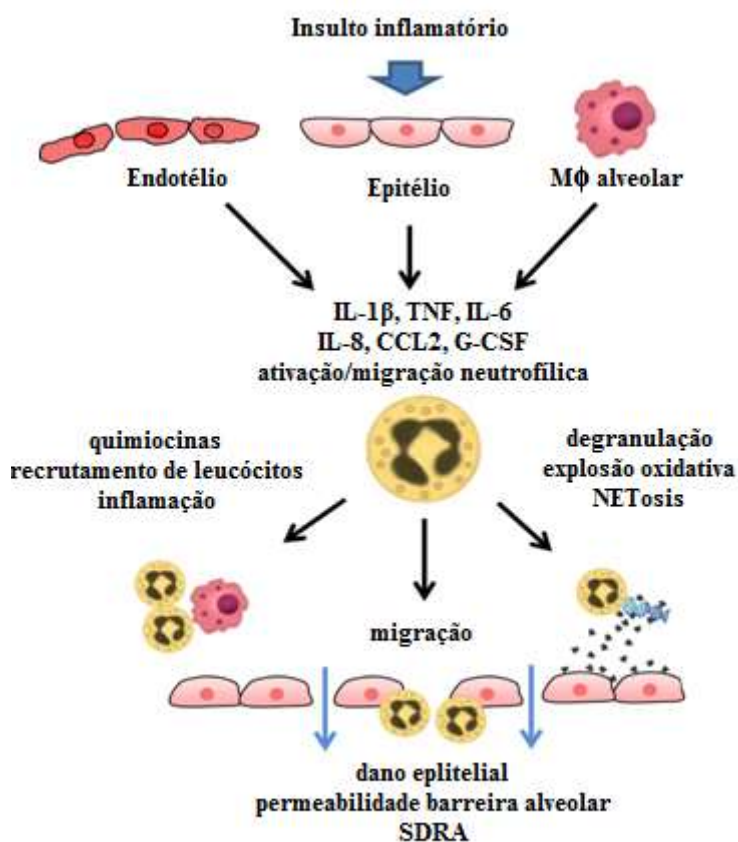


Figura 1. Papel de neutrófilos na síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). Adaptado de *Williams, A. E.; Chambers, R. C., 2014.*

No entanto, estes fatores também são tóxicos para as células hospedeiras e pode resultar em danos nos tecidos. A acumulação excessiva de neutrófilos na SDRA pode contribuir para a progressão da doença. O determinante central para o recrutamento de neutrófilos é a liberação de quimiocinas, incluindo o quimio atrator de neutrófilos, arquétipo de Interleucina-8 (IL-8), a partir de células residentes pulmonares. No entanto, a rede de quimiocinas no pulmão inflamado

é complexa e pode envolver várias outras quimiocinas, incluindo Quimiocina (C-X-C Motif) Ligante 10 (CXCL10), Quimiocina C-C-Motif Ligante 2 (CCL2), e Quimiocina C-C-Motif Ligante 7 (CCL7) (WILLIAMS; CHAMBERS, 2014).

1.2. Reparo do epitélio alveolar na lesão pulmonar aguda

Ainda não são completamente entendidos os fatores que determinam se ocorrerá a lesão fibrótica pulmonar ou restauração da arquitetura após a SDRA. Uma reparação do epitélio alveolar eficiente é capaz de reduzir o desenvolvimento de fibrose em modelos animais desde que a presença de um epitélio alveolar intacto precocemente suprima a proliferação fibroblástica e deposição de matriz (GEISER, 2003; SANTOS et al., 2006).

Uma eficiente restauração do epitélio na fase inicial da SDRA além de gerar recuperação efetiva do *clearance* do líquido alveolar, pode consequentemente prevenir a fibrose pulmonar. O processo de reparo inclui a interação célula-célula entre células tipo II e a matriz celular que são coordenadas por uma variedade de mediadores solúveis liberados no espaço alveolar durante a SDRA (GEISER, 2003; SANTOS et al., 2006).

Muitos desses mediadores têm sido encontrados em níveis elevados nos lavados broncoalveolares de pacientes com SDRA, como por exemplo, Interleucina-1 β (IL-1 β), Interleucina-6 (IL-6), IL-8 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (GEISER, 2003; BROWNE; PITCHUMONI, 2006; SANTOS et al., 2006; MATUTE-BELLO et al., 2008; MATUTE-BELLO et al., 2011; RANIERI, 2012).

O início do processo de reparação epitelial provavelmente apresenta-se na primeira fase da SDRA. Alguns estudos demonstram que a inibição de IL-1 β por antagonista de receptor da IL-1 (IL-1ra), significativamente reduz a reparação epitelial *in vitro*, enquanto que, bloqueando o TNF- α , nenhum efeito é induzido, sugerindo que a IL-1 β modular a maior fração de recuperação *in vitro* (GEISER, 2003).

1.3. SDRA e mediadores Inflamatórios

Tecidos severamente lesados são reconhecidos como produtores de uma

resposta inflamatória local e sistêmica. Essa resposta inflamatória acarreta em grande risco de falência orgânica como tem sido visto na SDRA (MATUTE-BELLO et al., 2008; MATUTE-BELLO et al., 2011; RANIERI, 2012). Alguns mecanismos fisiopatológicos têm sido propostos como responsáveis pela injúria pulmonar aguda e remota perpetuação sistêmica após a injúria local, como a liberação de mediadores pró-inflamatórios, atração e ativação de células polimorfonucleares (PMN), principalmente neutrófilos (GEISER, 2003; BROWNE; PITCHUMONI, 2006; SANTOS et al., 2006; IPAKTCHI et al., 2006; MATUTE-BELLO et al., 2008; MATUTE-BELLO et al., 2011; RANIERI, 2012).

A Fosfolipase A₂ (PLA₂) tem sido investigada por muitos autores (MUÑOS , et al., 2012; DE LUCA et al., 2013; MACHADO-ARANDA et al., 2013). Ela é ativada pela tripsina no duodeno removendo ácidos graxos dos lipídeos. Fisiologicamente, a superfície alveolar é recoberta por surfactante que previne colapso alveolar mantendo a tensão superficial (MUÑOS , et al., 2012; DE LUCA et al., 2013; MACHADO-ARANDA et al., 2013).

Um dos mais importantes componentes do surfactante pulmonar é o fosfolípídeo dipalmitoi-1-fosfatidicolina que é um perfeito substrato para a PLA₂. Sendo assim, pode-se sugerir que a destruição do surfactante que ocorre na SDRA pode estar sendo mediada pela ação da PLA₂. A reação básica da insuficiência pulmonar e SDRA é a destruição do surfactante (MUÑOS , et al., 2012; DE LUCA et al., 2013; MACHADO-ARANDA et al., 2013).

Outro mediador importante é o fator de ativação plaquetário (PAF), que é definido como um mediador biológico potente, cujos efeitos se manifestam em todo o organismo. O PAF atua na estimulação das células PMN e na regulação de sua interação com células endoteliais; facilitando a migração e ativação dos leucócitos nos tecidos (BROWNE; PITCHUMONI, 2006). O PAF é um componente estrutural da membrana lipídica e sua liberação ocorre através da ação da PLA₂.

Trabalhos demonstram que a inflamação sistêmica está associada com a ativação da coagulação e o sistema fibrinolítico. (FRANCO et al., 2000, BUSCH et al., 2004). O maior iniciador da cascata de coagulação é o fator tecidual (TF), sendo o receptor e cofator para o fator de coagulação VII no plasma. O TF é induzido por mediadores inflamatórios como a IL-6, IL-8, e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1) (BUSCH et al., 2004).

Normalmente o TF é expresso em células em contato direto com o sangue, mas podem ser expresso em células intravasculares principalmente monócitos e células endoteliais quando estimulados especialmente por estímulos inflamatórios incluindo o lipopolissacarídeo (LPS) *Escherichia coli*. Quando em níveis aumentados, o TF pode ser o responsável pelas manifestações trombóticas em diferentes estados inflamatórios (FRANCO et al., 2000).

Inúmeras citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α) também têm sido descritas como importantes no processo fisiopatológico da SDRA (MATUTE- BELLO, et al., 2008). Por exemplo, a IL-1 β desempenha papel fundamental na fisiopatologia da SDRA, uma vez que a ausência da produção de IL-1 β através do silenciamento do gene para IL-1 β ou mesmo através do bloqueio farmacológico da IL-1 β resultou na completa inibição da neutrofilia (LINDAUER et al., 2009).

Outra citocina que apresenta papel fundamental na fisiopatologia da SDRA é a IL-6 (MEDURI et al., 1995; BHATIA; MOOCHHALA, 2004; REIS GONÇALVES et al., 2012; OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2014). Níveis aumentados de IL-6 estão correlacionados com pobre prognóstico de pacientes com SDRA (MEDURI et al., 1995), além de apresentarem-se aumentados também em modelos experimentais de SDRA (MATUTE- BELLO et al., 2008; REIS GONÇALVES et al., 2012; OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2014), contribuindo para a perpetuação da inflamação também agindo como um adjuvante pró-coagulante (FU et al., 2012; REIS GONÇALVES et al., 2012; OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2014).

A IL-8 é um forte fator quimiotático para neutrófilos nos pulmões e altas concentrações desta citocina têm sido observadas nos pacientes com SDRA. DONNELLY et al. (1993) demonstraram que nos lavados broncoalveolares, os níveis de IL-8 são significativamente mais altos em pacientes que desenvolveram SDRA que aqueles que não desenvolveram, podendo também ser utilizado como um fator prognóstico para a doença (KURDOWSKA et al. 2002). A IL-8, a qual é uma potente quimiocina, responsável pelo recrutamento de neutrófilos, está aumentada na SDRA tanto no lavado broncoalveolar (LBA) quanto na circulação sistêmica (MATUTE- BELLO, et al., 2008). Além disso, os níveis de IL-8 também estão associados com os níveis de gravidade da SDRA além de se

correlacionarem com a taxa de mortalidade provocada pela SDRA (GEISER, 2003; BROWNE; PITCHUMONI, 2006; SANTOS et al., 2006; MATUTE-BELLO et al., 2008, MATUTE-BELLO et al., 2011; MUÑOS, et al., 2012; RAYMONDOS et al., 2012; DE LUCA et al., 2013; MACHADO-ARANDA et al., 2013).

Estudos experimentais demonstram que em modelos de sepsis, a cascata de citocinas consiste em TNF- α , IL-1 β e IL-6 (PETERSEN; PEDERSEN, 2005). As duas primeiras citocinas da cascata são TNF- α e a IL-1 β , sendo produzidas localmente.

Essas citocinas são usualmente referidas como pró-inflamatórias e tanto o TNF- α como a IL-1 β , estimulam a produção de IL-6. O TNF- α tem sido reportado como um importante modulador na injúria pulmonar aguda (YANG; CHEN; GE, 2007). Estudos experimentais têm sugerido que os níveis plasmáticos de TNF- α aumentam durante a injúria pulmonar e, bloquear seus efeitos biológicos, através de anticorpos, induz a uma diminuição da severidade da lesão (PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Além disso, injeções intra-venosas de TNF- α induzem à injúria pulmonar aguda com sequestro de neutrófilos e aumento da permeabilidade microvascular (BROWNE; PITCHUMONI, 2006; YANG; CHEN; GE, 2007).

A interleucina-17 (IL-17) é o membro fundador de uma nova família de citocinas que recentemente ganhou destaque devido à sua participação nas doenças auto-imunes em humanos e animais. A família da IL-17 é composto por seis membros, incluindo IL-17 (também chamado de IL-17A), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (também chamado de IL-25), e IL-17F (AGGARWAL, S., GURNEY, A. L., 2002; KOLLS, J. K., LINDEN, A., 2004).

Entre eles, a IL-17 e IL-17F são expressas por um novo subconjunto de células T CD4⁺ e as células T auxiliaadoras que desempenham função crítica na inflamação e auto-imunidade (CHEN, D., 2008).

Em um estudo realizado por HAGAU et al (2010), os autores demonstraram que quando comparado os níveis de IL-8, TNF- α e IL-17, os pacientes com SDRA de origem bacteriana, apresentaram níveis mais elevados quando comparados ao de origem viral.

1.4 Receptores Toll Like (TLRs) e SDRA

Os Receptores Toll Like (TLRs) são glicoproteínas tipo I integrais de

membrana possuindo um domínio extracelular e um domínio citoplasmático homólogo ao receptor para IL-1, o qual é denominado de domínio de receptor Toll-IL-1 (BALAMAYOORAN et al., 2010).

Os TLRs exercem um papel fundamental na resposta imune inata contra patógenos endógenos e exógenos. Atuam na defesa contra infecções bacterianas, microbacterianas, fúngicas e agentes patogênicos virais do pulmão (LAFFERTY, 2010; KOVACH, M. A; STANDIFORD, T. J. 2011).

Uma estratégia que é usada por TLRs para indução seletiva de uma resposta do hospedeiro, é o reconhecimento de estruturas microbianas originais denominadas padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Na literatura, são evidentes onze genes TLRs funcionais que desempenham papéis diferentes na defesa do hospedeiro, inflamação, autoimunidade e neoplasia, descobertos em animais e no ser humano (LAFFERTY, 2010; KOVACH, M. A; STANDIFORD, T. J. 2011).

O estímulo dos TLRs estimulam uma cascata de sinalização resultando em ativação do fator de transcrição nuclear (NF- κ B) e subsequente produção de citocinas e quimiocinas. O receptor de toll like 1 (TLR1), receptor de toll like 2 (TLR2), receptor de toll like 4 (TLR4), receptor de toll like 5 (TLR 5) e receptor de toll like 6 (TLR 6) estão localizados na superfície celular, enquanto os receptor de toll like 3 (TLR 3), receptor de toll like 7 (TLR 7) e receptor de toll like 9 (TLR 9) estão localizados na membrana endosomal. O ligante de TLR4 liga-se ao TLR4 em associação com a proteína de ligação do LPS (Proteína ligante - LBP), ao grupo de diferenciação 14 (CD14) e ao fator de diferenciação mielóide 2 (MD2) (BALAMAYOORAN et al., 2010). Exemplos prototípicos de PAMPs incluem LPS, um componente da membrana exterior de bactérias gram-negativas que estimula TLR4 (QURESHI, 1999).

Especificamente, o TLR 4 apresenta papel importante no reconhecimento de LPS e na ativação da cascata inflamatória. Um estudo realizado por BEN et al (2010), os autores evidenciaram que o TLR4 desempenha um papel importante na patogênese da isquemia-reperfusão intestinal aguda induzida, principalmente no processo lesivo e inflamatório do pulmão e que a kinase p38 e NF- κ B pode estar envolvida na sinalização de TLR4 durante os processos de isquemia-reperfusão intestinal aguda.

Na SRDA, a super-expressão do TLR4 têm sido observada tanto nos estudos clínicos quanto nos estudos experimentais (BALAMAYOORAN et al.,

2010; BEN et al., 2010; HE et al., 2012). A ativação do TLR4, por exemplo, tem demonstrado ter um papel importante no processo fibrótico na fase inicial da SDRA por ativar fibroblastos (HE et al., 2012). Além disso, a expressão de TLR4 também está relacionada à ativação não somente de neutrófilos (SMUDA et al., 2011), mas também de linfócitos T em modelos de SDRA (MATSUGUCHI et al., 2000).

Alguns outros dados já indicam que o TLR2 e TLR4 promovem a inflamação do pulmão em diferentes respostas, seja ela ocasionada por LPS ou por bleomicina (JIANG et al, 2006; QURESHI et al., 2006). A ativação de TLR 4 também pode promover a lesão pulmonar em resposta à exposição ao ozônio (KLEEBERGER, 2001) .

Em estudo realizado por HE et al (2014), utilizando TLR4 mAb, que é um inibidor de sinalização de TLR4 em um modelo de LPA induzida por LPS, os autores evidenciaram a supressão nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-6.

Em estudo realizado por YANO et al (2010), os autores demonstraram que o exercício exaustivo realizado em camundongos, reduz TNF-alfa e produção de IFN-gama em resposta a R-848, através do TLR 7.

1.5. Estresse oxidativo e SDRA

Conforme descrito anteriormente, a SDRA é caracterizada por hipoxemia progressiva e edema pulmonar, com crescente ativação de migração de neutrófilos, o que favorece a destruição endotelial capilar e epitelial alveolar (WARE E MATTHAY, 2000). Estas células inflamatórias transmigram através do endotélio e do epitélio para o espaço alveolar e liberam uma variedade de compostos pró-inflamatórias, incluindo enzimas proteolíticas, espécies reativas de oxigênio e citocinas inflamatórias. Acredita-se que um aspecto chave desta resposta inflamatória pulmonar é mediado por níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio (CHOW, et al., 2003).

O mecanismo de ação LPS envolve a via do estresse oxidativo em algumas doenças como a lesão pulmonar relacionada à sepse. Estudos anteriores sugerem que as alterações no metabolismo antioxidante

desempenham um papel importante no desenvolvimento de lesão pulmonar induzida por LPS em animais (THIMMULAPPA, et al., 2006).

Algumas evidências experimentais já indicam que o exercício regular é capaz de aumentar as defesas antioxidantes no coração, músculo e no fígado de ratos (VENDITTI E DI MEO, 1997) e também para evitar a peroxidação de lipídeos e de proteínas para o dano oxidativo presente na lesão pulmonar (PINHO ET AL., 2006, 2009).

Em trabalho realizado por (DE CUNHA, et al. 2013), os autores evidenciaram um aumento significativo na enzima antioxidante superóxido dismutase no grupo de animais que foram submetidos ao exercício aeróbio de intensidade moderada, realizado durante 10 semanas.

1.6. Exercício aeróbio (EA) e Sistema Imune

Os efeitos anti-inflamatórios do Exercício Aeróbio (EA) têm sido extensivamente investigados (MATSUGUCHI et al., 2000; CERVANTES-BARRAGAN et al., 2007). De maneira geral, há um consenso na literatura de que o EA de alta intensidade e longa duração desencadeia uma resposta pró-inflamatória enquanto as atividades de intensidade leve e moderada e de média ou longa duração desencadeiam uma resposta anti-inflamatória (MATSUGUCHI et al., 2000; MOLDOVEANU et al., 2001; COSTA-ROSA; VAISBERG, 2002; PETERSEN; PEDERSEN, 2005; ZIEKER et al., 2005; CERVANTES-BARRAGAN et al., 2007;).

Grande parte dos efeitos imunomoduladores do EA têm sido demonstrados em casos de aterosclerose, diabetes, câncer de cólon e de mama e de doenças cardíacas isquêmicas. Esses estudos demonstram que as respostas são reguladas por inúmeras citocinas e/ou quimiocinas dentre elas: IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1 e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) (MATSUGUCHI et al., 2000). Entretanto, um número maior de estudos tem demonstrado que os efeitos anti-inflamatórios do EA é mediado pelo aumento da síntese de Interleucina-10 (IL-10) (MATSUGUCHI et al., 2000; COSTA-ROSA; VAISBERG, 2002; PETERSEN; PEDERSEN, 2005; ZIEKER et al., 2005; CERVANTES-BARRAGAN et al., 2007).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e previne a produção de mediadores pró-inflamatórios, particularmente TNF- α por macrófagos e células T, além de inibir a liberação de IL-6 e IL-1 β e estimular a síntese de IL-1ra (MATSUGUCHI et al., 2000; COSTA-ROSA; VAISBERG, 2002; PETERSEN; PEDERSEN, 2005; ZIEKER et al., 2005; CERVANTES-BARRAGAN et al., 2007). Além do mais, alguns estudos têm demonstrado que esse efeito do EA sobre a síntese de IL-10 não é apenas sistêmico, mas também ocorre nos pulmões (PEDERSEN; TOFT, 2000; MOLDOVEANU et al., 2001; VIEIRA et al., 2007; VIEIRA et al., 2008; VIEIRA et al., 2011; OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2014).

A IL-10 é conhecido por ser produzida principalmente por células Treg células mas também por células T helper 2 (Th2), T helper 1 (Th1), T helper 17 (Th17), monócitos, macrófagos e células dendríticas (CD) (MAYNARD; WEAVER, 2008). IL-10 regula negativamente ou inibe completamente a expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores solúveis, assim, comprometendo ainda mais a capacidade de células T efectoras para sustentar respostas inflamatórias (MAYNARD; WEAVER, 2008).

1.7. Exercício aeróbio (EA) e Doenças Pulmonares

Inúmeros trabalhos têm demonstrado que o EA apresenta efeitos benéficos sobre a resposta imunológica/inflamatória dos pulmões em diferentes modelos experimentais de doenças pulmonares. Dentre esses trabalhos destacam-se os efeitos anti-inflamatórios do EA em modelos de asma (PASTVA et al., 2004; PASTVA et al., 2005; VIEIRA et al., 2007; et al., 2008; et al., 2011; et al., 2013; SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2012; OLIVO et al., 2012; SILVA et al., 2014), doença pulmonar obstrutiva crônica (MENEGALI et al., 2009; TOLEDO et al., 2012), lesão pulmonar aguda (MUSSI et al., 2008; RAMOS et al., 2010; REIS GONÇALVES et al., 2012) e até em resposta aos efeitos pró-inflamatórios da poluição atmosférica (VIEIRA et al., 2012).

Alguns estudos têm demonstrado que boa parte do aumento da produção de IL-10 durante o exercício físico ocorre pelos músculos esqueléticos ativado durante o exercício (PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

Em trabalho realizado em modelo de asma, os autores demonstraram o efeito do exercício aeróbio de baixa e moderada intensidade em diminuir a

infiltração eosinofílica nas vias aéreas, vasos pulmonares e no parênquima pulmonar e também diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias T helper tipo 2 (Th2) Interleucina-4 (IL-4) e Interleucina-5 (IL-5), assim como o NF-kB, comparados ao grupo asma. Esses mesmos grupos apresentaram um aumento nos níveis de IL-10, demonstrando que parte destes efeitos poderia estar sendo mediados pelo aumento da expressão dessa citocina anti-inflamatória (VIEIRA et al., 2007; VIEIRA et al., 2008).

Em estudo realizado por SILVA et al (2010), os autores demonstraram um aumento de Imunoglobulina E (IgE) e Imunoglobulina G (IgG) no grupo asma + exercício aeróbio, e redução de eosinófilos, células do grupo de diferenciação 3+ (CD3+), do grupo de diferenciação 4+ (CD4+), IL-4, IL-5, Interleucina-13 (IL-13), NF-kB nas vias aéreas, na remodelação, na síntese de muco, na espessura do músculo liso comparado com o grupo asma. Houve aumento significativo de IL-10 e IL-1ra nesse mesmo grupo.

Mais recentemente, SILVA et al (2014) mostraram que o grupo asma induziu um aumento de leucócitos nas vias aéreas. Após 7 dias, o exercício aeróbio foi capaz de reverter o número de eosinófilos induzida por ovalbumina (OVA) e migração de macrófagos das vias aéreas, a expressão de IL-5 e demais indutores. Contudo, a reversão total ocorreu somente após 15 dias ao exercício aeróbio, sendo mantidos até o dia 30.

Segundo VIEIRA et al (2014), o exercício aeróbio de baixa intensidade reduziu os níveis de IL-4, IL-5, IL-13 no LBA, os níveis séricos de IL-5. Por outro lado houve o aumento dos níveis de IL-10 no soro e LBA. Além disso, reduziu a ativação de leucócitos, quimiocinas e moléculas de adesão. EA também diminuiu a expressão de fatores de crescimento.

Em estudo realizado em um modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica, os autores mostraram que o exercício inibiu substancialmente o aumento das espécies reativas de oxigênio no LBA e expressão de isoprostano 8 no tecido pulmonar induzida por cigarro . Além disso, o exercício inibiu significativamente os decréscimos nos níveis de IL-10 e superóxido dismutase (SOD) induzida pela exposição à fumaça do cigarro Exercício também aumentou o número de células que expressam a glutathione peroxidase (GPX) (TOLEDO et al, 2012).

Em um segundo trabalho realizado com exercício aeróbio e fumo, os autores relataram que o exercício físico atua auxiliando na diminuição da

produção de oxidante e o aumento da atividade do sistema de defesa antioxidantes enzimáticos, mas não foi capaz de reverter danos induzidos pelo cigarro (MENEGALI et al, 2009).

Em um modelo experimental de poluição atmosférica, desenvolvida em camundongos, o exercício aeróbio inibiu o aumento induzido por partículas de exaustão de diesel nos níveis de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico exalado e de células diferenciais totais. Os níveis de IL-6 e TNF- α no fluido do LBA, nível de neutrófilos, densidade de colágeno no parênquima pulmonar, níveis de IL-6, KC e TNF- α no plasma e a expressão de IL-1 β , KC e TNF- α por leucócitos no parênquima pulmonar (VIEIRA et al, 2012).

1.8. Exercício aeróbio (EA) e SDRA

Em estudo realizado por MUSSI et al (2008), os autores demonstraram que a atividade física aeróbia realizada através da natação, em ratos Wistar, previamente à indução da isquemia e reperfusão foi capaz de inibir a elevação dos níveis de extravasamento de proteína, e de IL-1 β e do TNF- α , sem inibir os aumentos nos níveis de mieloperoxidase (MPO). Entretanto, os autores não avaliaram os efeitos do exercício sobre as alterações da mecânica pulmonar, sobre a inflamação pulmonar, exceto sobre os níveis de MPO. De maneira mais importante, os autores também não avaliaram um grupo somente submetido à atividade física aeróbia.

Em um estudo realizado por RAMOS et al (2008), demonstrou pela primeira vez que o condicionamento aeróbio prévio através do treinamento de natação de baixa intensidade inibe a inflamação neutrofílica em um modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS e que esses efeitos parecem estar correlacionados com a diminuição dos níveis de óxido nítrico exalado.

Em um estudo realizado por GONÇALVES et al. (2012), os autores investigaram os mecanismos envolvidos nos efeitos protetores do exercício aeróbio em um modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos. Os resultados apresentados demonstraram que o LPS resultou em aumento da instilação níveis de óxido nítrico exalado, números elevados de células totais e de neutrófilos no LBA, número superior de neutrófilos e de TNF-

α , células positivas no parênquima pulmonar, valores elevados de resistência e elastância pulmonar, aumento das proteínas de lavagem pulmonar, aumento nos níveis plasmáticos de IL-6 e IL-10 e aumento nos níveis de IL-1 β , IL-6 e KC no LBA.

Também demonstraram que o exercício de baixa intensidade realizado durante cinco semanas antes da instilação intratraqueal de LPS, promoveu a diminuição da resistência e elastância pulmonar, inibiu a infiltração de neutrófilos e de tecido da expressão de TNF- α no tecido pulmonar, promoveu a diminuição da concentração de óxido nítrico exalado, aumentou a expressão de SOD-2, receptores de glicocorticóides, IL-6 e IL-10 no tecido pulmonar e os níveis de IL-1 β no LBA (GONÇALVES, 2012).

Estes resultados sugerem que o EA pode desempenhar um papel importante na proteção dos efeitos inflamatórios no pulmão, alterando o perfil inflamatório e aumentando a expressão de anti-oxidantes no tecido pulmonar (RAMOS et al, 2008).

Como parte dos possíveis mecanismos dos efeitos imunomoduladores do EA, encontram-se os efeitos do EA reduzindo a expressão dos TLRs em monócitos e em músculo esquelético (GLEESON et al, 2006). Assim, fica a hipótese de que o EA poderia aumentar a síntese de IL-10 nos pulmões e também reduzir a expressão dos TLRs nos pulmões dos animais com SDRA induzido por LPS, como parte dos mecanismos envolvidos nos efeitos anti-inflamatórios do EA.

Portanto, uma vez que tem sido demonstrado que EA de intensidade leve e moderada, realizado com frequência de três a cinco vezes por semana e de duração entre 30 e 60 minutos apresenta efeitos benéficos sobre o sistema imune, com repercussão direta sobre os pulmões em diferentes doenças pulmonares, avaliamos os efeitos de quatro semanas de exercício aeróbio em esteira a uma intensidade de 60% da carga máxima, a uma frequência de cinco vezes por semana e com duração de 60 minutos por sessão, acreditamos que o EA realizado conforme os parâmetros apresentados acima podem apresentar efeitos benéficos sobre os leucócitos em um modelo experimental de lesão pulmonar aguda intra e extrapulmonar induzido por LPS.

1.9. Justificativa

Um dos mais importantes mecanismos que determina a severidade da injúria pulmonar na SDRA é a magnitude da lesão da barreira epitelial. A possibilidade de reparar o epitélio num estágio precoce é o maior determinante da recuperação. Tratamentos específicos para acelerar o reparo do epitélio alveolar ainda não existem. Muitas das modalidades terapêuticas testadas atualmente baseiam-se na tentativa de diminuir a inflamação pulmonar para minimizar a lesão inicial. Sabendo-se que grande parte do processo inflamatório se dá pela ativação local e sistêmica de citocinas como TNF- α e IL-1 β e que exercícios aeróbicos de intensidade leve e moderada já têm demonstrado possuir efeito na diminuição destas citocinas via aumento da liberação de IL-10 nos pulmões, o presente projeto teve como hipótese que:

O EA de intensidade moderada realizado previamente poderia resultar em uma menor resposta à injúria pulmonar realizado em modelos experimentais de SDRA intra e extrapulmonar induzida por LPS, em um modelo experimental de SDRA.

O EA seria capaz de favorecer o aumento da produção da citocina anti-inflamatória IL-10, seguido de sua atuação com efeitos na redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, realizado em modelos experimentais de SDRA intra e extrapulmonar induzida por LPS, em um modelo experimental de SDRA.

O EA seria capaz de modular a expressão de TLRs nos pulmões dos animais em modelos experimentais de SDRA intra e extrapulmonar induzida por LPS, realizado em um modelo experimental de SDRA.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar o papel da IL-10 sobre os efeitos anti-inflamatórios do EA de intensidade moderada na SDRA intrapulmonar e extrapulmonar induzida por LPS.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do EA sobre os níveis celulares no LBA na SDRA intrapulmonar e extrapulmonar induzida por LPS.

Avaliar os efeitos do EA sobre o número de neutrófilos no parênquima pulmonar na SDRA intrapulmonar e extrapulmonar induzida por LPS.

Avaliar os efeitos do EA sobre os níveis de citocinas pulmonares e sistêmicas pró e anti-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, CXCL1/KC, IL-10, interferon- γ (IFN- γ) e TNF- α) na SDRA intrapulmonar e extrapulmonar induzida por LPS.

Avaliar os efeitos do EA sobre a expressão do TLR 4 e 7 nos homogenatos de tecido pulmonar na SDRA intrapulmonar e extrapulmonar induzida por LPS.

Avaliar os efeitos do EA sobre a expressão de SOD, ânion e QL nos homogenatos de tecido pulmonar na SDRA intrapulmonar e extrapulmonar induzida por LPS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Comitê de Ética

O projeto do atual trabalho foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho e foi aprovado com protocolo de número AN0035.2013.

3.2. Animais

Os animais foram obtidos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e mantidos no Biotério Central da Universidade Nove de Julho, em condições controladas de umidade (50%-60%), luminosidade (12 horas claro/12 horas escuro) e temperatura (22°C - 25°C). Foram utilizados 30 Camundongos C57Bl/6, machos, com 8 semanas de idade, pesando aproximadamente 20 gramas, os quais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais (n = 5 animais em cada grupo):

3.3. Grupos experimentais

3.3.1. Experimento em animais C57Bl/6

Os animais foram divididos em 6 grupos, sendo eles:

1 – Controle (Co): animais submetidos à 5 semanas de repouso, após este período receberam administração intratraqueal de NaCl 0,9%, e sacrificados 24 horas após esta administração.

2 – LPS intratraqueal (LPS it): animais submetidos à 5 semanas de repouso, após receberam administração intratraqueal de LPS *Escherichia Coli*

(E. Coli) (10µg/animal), e sacrificados 24 horas após essa administração.

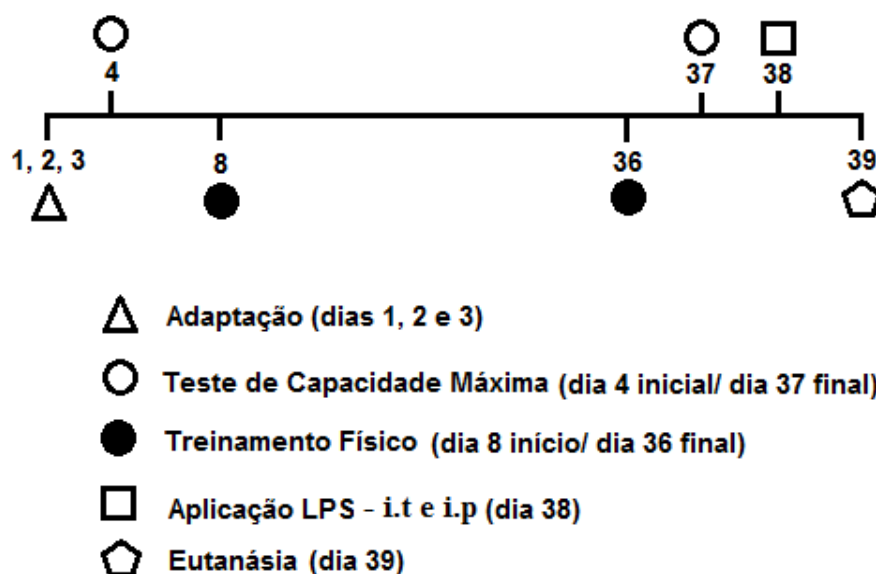
3 – LPS intraperitoneal (LPS ip): animais submetidos à 5 semanas de repouso, após receberam administração intraperitoneal de LPS E. Coli (100µg/animal), e sacrificados 24 horas após essa administração.

4 – Exercício aeróbio (EA): animais submetidos previamente ao exercício aeróbio de intensidade moderada durante 4 semanas.

5 – Exercício aeróbio + LPS intratraqueal: (EA+LPS it): animais submetidos previamente ao exercício aeróbio de intensidade moderada (60% da máxima capacidade física) durante 4 semanas, submetidos à administração intratraqueal de E. Coli LPS (10µg/animal), 24 horas após o término da última sessão e sacrificados 24 horas após essa administração.

6 – Exercício aeróbio + LPS intraperitoneal: (EA+LPS ip): animais submetidos previamente ao Exercício aeróbio de intensidade moderada (60% da máxima capacidade física) durante 4 semanas, após receberam injeção intraperitoneal de LPS E. Coli (100µg/animal) e sacrificados 24 horas após essa administração).

3.4. Protocolo experimental



3.5. Modelo de Exercício aeróbio de intensidade moderada

Os animais foram adaptados em esteira ergométrica para camundongos (Imbramed, RS, Brasil) durante 3 dias (0,3 km/h) por 15 minutos. No dia seguinte foram submetidos ao teste de esforço conforme previamente descrito. O teste de esforço foi repetido ao final do protocolo para avaliar quanto os animais melhoraram ou não o condicionamento físico (REIS GONÇALVES et al., 2012; VIEIRA et al., 2007, VIEIRA et al. 2008, VIEIRA et al. 2011). Os animais foram treinados a uma intensidade moderada, correspondendo a 60% da máxima velocidade alcançada no teste de esforço. O treinamento de intensidade moderada foi realizado durante 4 semanas, 5 vezes por semana, 1 hora por sessão de treinamento (REIS GONÇALVES et al., 2012; VIEIRA et al., 2007, VIEIRA et al. 2008, VIEIRA et al. 2011).



Figura 2. Demonstração do Exercício Aeróbio de moderada intensidade.

3.6. Modelo de SDRA intrapulmonar e extrapulmonar

Vinte e quatro horas após a última sessão de treinamento físico, cada animal recebeu a administração intra-traqueal de 10µg de LPS e foram avaliados 24 horas após essa administração (para reprodução do modelo de SDRA intrapulmonar). Para o modelo de lesão pulmonar aguda extrapulmonar, 100µg de LPS foram administrados via injeção intra-peritoneal e da mesma maneira, os animais foram avaliados 24 horas após a aplicação (SANTOS et al., 2006). O lipopolissacarídeo utilizado foi LPS de E. coli [026:B6, 10µg] (Sigma Aldrich).



Figura 3. Demonstração do modelo de SDRA Intrapulmonar – LPS it (1a e 2a) e modelo de SDRA extrapulmonar – LPS ip (1b).

3.7. Eutanásia dos animais

Os experimentos foram realizados 24 horas após a administração de LPS e o teste físico final, e após anestesia dos animais com quetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente). Sob anestesia, os animais foram eutanasiados através exsanguinação da aorta abdominal (o sangue total foi coletado e utilizado para análises).

3.8. Coleta do sangue e análise do soro sanguíneo

Foi realizada incisão cirúrgica no abdômen do animal e coletada aproximadamente 1 ml da amostra de sangue da artéria aorta abdominal. As amostras foram centrifugadas 6000 rpm, à 04°C, por 10 minutos). O soro resultante foi aliquotado e armazenado a -20 °C para análise das citocinas IL-1 β , IL-6, CXCL1/KC, IL-10, IFN- γ e TNF- α através da técnica imunoenzimática – ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

3.9. Avaliação da inflamação pulmonar no LBA

Após anestesia, coleta sanguínea e exsanguinação, os animais foram traqueostomizados e canulados e os pulmões foram lavados com 3 x 0,5 ml de tampão fosfato salino (PBS). O volume do lavado recuperado foi centrifugado (1600 rpm, durante 05 minutos) a 05°C, e o sobrenadante coletado e armazenado a – 70° C para análise das citocinas por meio de ELISA. O botão de células foi ressuspensionado em 1 ml de cloreto de sódio estéril (NaCl 0,9%) e utilizado para avaliação do número de células total e diferencial.

Vinte microlitros foram utilizados para contagem do número total de células com auxílio de uma câmara de Neubauer. Duzentos microlitros foram utilizados para contagem diferencial após centrifugação (05 minutos, 1300 rpm, 4 °C) (modelo Cytospin-2, Shandon Instruments Sewickley, PA) e coloração das lâminas com May-Grunwald-Giemsa. Foram contadas 300 células por lâmina (REIS GONÇALVES et al., 2012; VIEIRA et al., 2007, VIEIRA et al. 2008, VIEIRA et al. 2011).

3.10. Análise quantitativa de neutrófilos no parênquima pulmonar

Com o intuito de avaliar os efeitos do EA sobre a densidade de neutrófilos no espaço parênquima pulmonar, o pulmão esquerdo foi coletado após infusão de 0,5 ml de Tissue Tek® e congelado a -70°C. Utilizando-se de um criostato, cortes de 4 μ m foram realizados e as lâminas coradas com o corante hematoxilina e eosina (GONÇALVES et al., 2012; OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2014). A análise quantitativa da densidade de neutrófilos no parênquima foi realizada através da técnica morfométrica (GONÇALVES et al., 2012; OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2014).

3.11. Avaliação dos níveis de citocinas no LBA e no soro por ELISA

Os níveis de IL-1 β , IL-6, CXCL1/KC, IL-10, TNF- α e IFN- γ no LBA e soro foram avaliados através dos kits da BD Biosciences, Biolegends e da R&D Systems.

A avaliação dos níveis de citocinas de amostras de LBA e soro com a utilização dos kits da BD Biosciences, Biolegends foi realizada de acordo com os procedimentos do ensaio especificado pelo kit, sendo as seguintes:

1 – Adição de 100ul do Anticorpo (Ac) de captura diluído em cada poço. Incubação feita por período “*overnight*” à 4°C;

2 – Aspiração do conteúdo e 5 lavagens com tampão especificado no kit, seguido da secagem da placa, invertendo a placa e movimentando-a contra as toalhas de papel limpo;

3 – Bloqueio da placa: 200 ul do diluente de ensaio em cada poço. Incubação por 1 hora à temperatura ambiente;

4 - Repetido a aspiração e lavagem especificado no passo 2.

5 – Adição das amostras, com volume final de 100ul por poço. Preparo da curva (realizada através da colocação de 100ul do standard/poço, seguido de diluição em série). Incubação por 2 horas em temperatura ambiente;

6 - Repetido a aspiração e lavagem especificado no passo 2.

7 – Adição de 100 ul do Ac de detecção diluído em cada poço. Incubação por 1 hora em temperatura ambiente;

8 - Repetido a aspiração e lavagem especificado no passo 2.

9 – Adição de 100 ul de estreptavidina peroxidase (SAv-HRP) diluído em cada poço. Incubação por 30 minutos à temperatura ambiente;

10 – Aspiração do conteúdo e 7 lavagens com tampão especificado no kit, seguido da secagem da placa, invertendo a placa e movimentando-a contra as toalhas de papel limpo;

11 – Adição de 100 ul da solução de substrato tetrametilbenzedina (TMB) em cada poço. Incubação por 30 minutos, no escuro, à temperatura ambiente;

12 – Adição de 50 ul de solução de parada em cada poço;

13 - Leitura da placa realizada dentro de 30 minutos, à 450 nm.

A avaliação dos níveis de citocinas de amostras de LBA e soro com a

utilização dos kits da R&D Systems. foi realizada de acordo com os procedimentos do ensaio especificado pelo kit, sendo as seguintes:

1 – Adição de 100ul do Ac de captura diluído em cada poço. Incubação feita por período “*overnight*” em temperatura ambiente;

2 – Aspiração do conteúdo e 3 lavagens com tampão especificado no kit, seguido da secagem da placa, invertendo a placa e movimentando-a contra as toalhas de papel limpo;

3 – Bloqueio da placa: 300 ul do diluente de ensaio em cada poço. Incubação por 1 hora à temperatura ambiente;

4 – Repetido a aspiração e lavagem especificado no passo 2.

5 – Adição das amostras, com volume final de 100ul por poço. Preparo da curva (realizada através da colocação de 100ul do standard/poço, seguido de diluição em série). Incubação por 2 horas em temperatura ambiente;

6 - Repetido a aspiração e lavagem especificado no passo 2.

7 – Adição de 100 ul do Ac de detecção diluído em cada poço. Incubação por 2 horas em temperatura ambiente;

8 - Repetido a aspiração e lavagem especificado no passo 2.

9 – Adição de 100 ul de SAv-HRP diluído em cada poço. Incubação por 20 minutos à temperatura ambiente;

10 – Repetido a aspiração e lavagem especificado no passo 2.

11 – Adição de 100 ul da solução de substrato TMB em cada poço. Incubação por 20 minutos, no escuro, à temperatura ambiente;

12 – Adição de 50 ul de solução de parada em cada poço;

13 - Leitura da placa realizada dentro de 30 minutos, com a utilização de um leitor de microplacas fixado para 450 nm.

3.12. Avaliação da expressão de TLRs nas proteínas dos pulmões

A avaliação da expressão de TLR4 e TLR7 no tecido pulmonar foi realizada com o intuito de avaliar se os efeitos antiinflamatórios desencadeados pelo treinamento aeróbio no modelo de lesão pulmonar aguda por LPS é resultante de um efeito do treinamento aeróbio sobre os leucócitos pulmonares, os quais exercem um papel central no desenvolvimento na fisiopatologia da

lesão pulmonar aguda. A avaliação da expressão dos TLRs foi realizada através da técnica de western blotting.

O pulmão direito foi homogeneizado em nitrogênio líquido em solução de lise (RIPA Lysis Buffer) contendo inibidor completo de proteases e fosfatases. Após a homogeneização, o material ficará em gelo por 30 minutos e então centrifugado a 13300 rpm por 20 minutos. Após a centrifugação, foi coletado o sobrenadante e realizado a quantificação de proteínas pelo método de Ácido bicinchonínico (BCA) (BCA Pierce Thermo Scientific, EUA). Cinquenta microgramas de proteína foram transferidas para um gel de poliacrilamida e então transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada então com os seguintes anticorpos primários: TLR4 e TLR7. As proteínas foram visualizadas utilizando-se anticorpos secundários horseradish conjugados seguido por quimiluminescência. A avaliação densitométrica das bandas foi realizada utilizando-se o software Image J (NIH, EUA).

3.13. Avaliação do perfil de estresse oxidativo

Coleta do tecido: Após a coleta do LBA, os pulmões foram coletados. O lobo superior esquerdo foi lavado em solução salina e congelado a -70°C para análise do estresse oxidativo. Cerca de 50mg foi utilizado para a avaliação de SOD, QL e ânion.

Preparação do tecido: O tecido pulmonar foram homogeneizados durante 30 segundos em um homogeneizador Ultra-Turrax, com KCl 1,15% e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100mmol/L em isopropanol e na quantidade de 10µL/mL de KCl adicionado. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3000rpm, em centrífuga refrigerada entre 0 e 4°C, e o sobrenadante foi congelado em freezer a -70°C para as dosagens (Llesuy et al., 1985).

Dosagem de Proteínas: As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg/mL (Lowry et al., 1951).

3.13.1. Quimioluminescência (QL)

A lipoperoxidação foi avaliada por quimioluminescência. O ensaio de quimioluminescência foi realizado com uma cremalheira de cintilação líquida LKB Beta espectrômetro 1215 (LKB AB Produtor, EUA) no modo à temperatura ambiente (25 ° C a 27 ° C) para fora-de-coincidência. Os sobrenadantes foram diluídos em KCl 140 mM e tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, e adicionada a tubos de vidro, os quais foram colocados em frascos de cintilação; 3 mM de terc-butil-hidroperóxido foi adicionado, e a quimioluminescência foi determinada ao nível máximo de emissão (GONZALEZ, et al 1991; IRIGOYEN , et al. 2005).

3.13.2. Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD foi medida por espectrofotometria em homogeneizados de pulmão, por inibição taxa de pyrogallol auto-oxidação a 420 nm. A atividade enzimática foi relatado em U / mg de proteína.

A técnica utilizada foi baseada na inibição da reação do radical superóxido com o piragalol. Uma vez que não se consegue determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, se utiliza a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector. A oxidação do pirogallol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm durante 2 minutos.

A atividade da SOD foi determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogallol oxidado. No meio de reação, foram utilizados 20 µL de homogeneizado, 973 µL de tampão Tris-Fosfato a 50 mmol/L (pH 8,2), 8 µL de pirogallol a 24 mmol/L, 4 µL de CAT a 30 µmol/L. Esta curva obtida foi utilizada como branco. Foi também feita uma curva padrão utilizando três concentrações distintas de SOD (0,25U, 0,5U e 1U), através da qual foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos.

3.13.3. Ânion superóxido

O ânion superóxido foi determinado em homogenatos de pulmão por cálculo da taxa de oxidação de adrenalina a 480 nm, conforme descrito por McCord e Fridovich (MC CORD, J. M., FRIDOVICH, I., 1969)

3.14. Análise estatística

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

4. RESULTADOS

4.1. Teste de treinamento físico aeróbio em esteira

Animais não treinados mostraram uma diminuição significativa na capacidade de exercício máximo entre o primeiro e o segundo teste (teste 1 = 1,2 km / h, teste 2 = 1,0 km / h, $p < 0,01$). Animais treinados não mostraram diferença na capacidade de exercício máximo entre o primeiro e o segundo teste (teste 1 = 1,3 km / hora, o teste 2 = 1,3 km / hora).

4.2. Contagem de células totais no sangue

Tabela 1. Contagem Total no Sangue (cél/s/mm²)

Grupos	Controle	EA	LPS it	EA+LPS it	LPS ip	EA+LPS ip	p
Total	50±2,7	33,2±1,5	114,85±3,1*	63,66±2	68,36±2,2	57,4±1,8	<0,001

*indica o efeito significativo de LPS sobre contagem de células. Valores expressos em média ± DP.

4.3. Contagem de células totais e diferenciais no LBA

Tabela 2. Contagem total e diferencial no LBA (cél/s/mm²)

Grupos	Controle	EA	LPS it	EA+LPS it	LPS ip	EA+LPS ip	P
Total	30,4±3,08	18±1,57	89±4,5*	51,4±2,81	68,6±3,2	48,2±2,31	<0,001
Macrófago	241,2±2,17	235,2±2	35,4±0,37	186,6±1,5	60±0,7	201±1,9	ns
Neutrófilo	2,4±0,3	00	260,4±4,4*	106,8±2,6	234±3,7*	85,8±2	<0,001
Linfócito	22,8±1,1	21,6±1	4,2±0,3	6,6±0,7	06±0,5	7,2±0,9	ns

*indica o efeito significativo de LPS sobre contagem de células. ns: não significativo. Valores expressos em média ± DP.

4.4. Avaliação da inflamação pulmonar no LBA

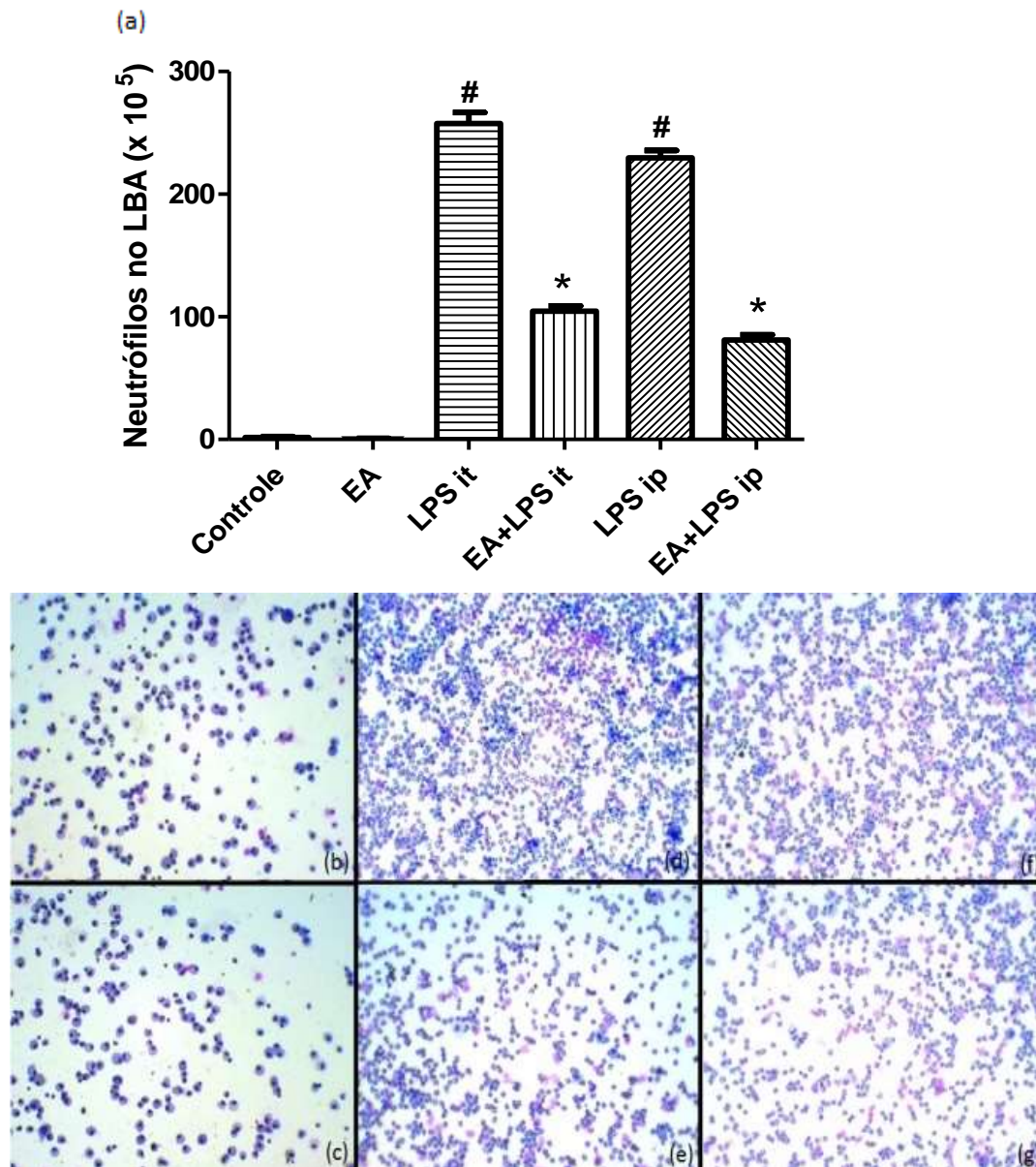


Figura 4. Acumulação de neutrófilos no lavado broncoalveolar. Em (a) * indica efeito significativo do EA em reduzir a acumulação de neutrófilos no LBA, tanto LPS it. e LPS ip. ($P < 0,001$). # indica efeito significativo do LPS em aumentar os níveis de células PMN no LBA ($p < 0,001$). A microfotografia ilustra a densidade de neutrófilos nos seis grupos: b = Co, c = EA, d = LPS it, e = EA + LPS it, f = LPS ip, g = EA + LPS ip. LPS lipopolissacarídeo. EA- exercício aeróbico, LPS it - lipopolissacarídeo intratraqueal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal. Aumento de 100x.

4.5. Análise quantitativa de neutrófilos no parênquima pulmonar

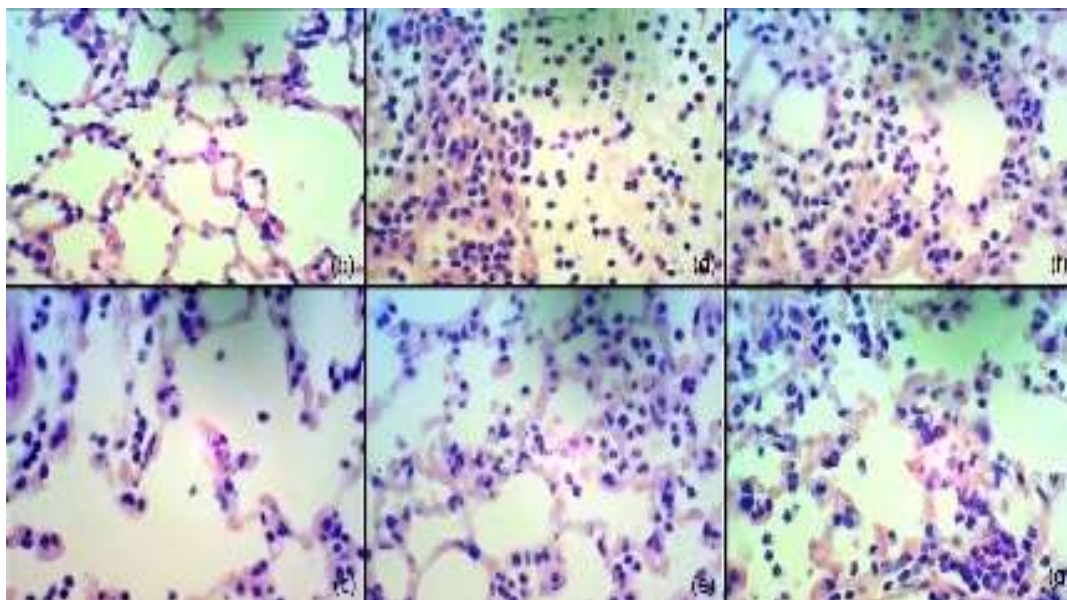
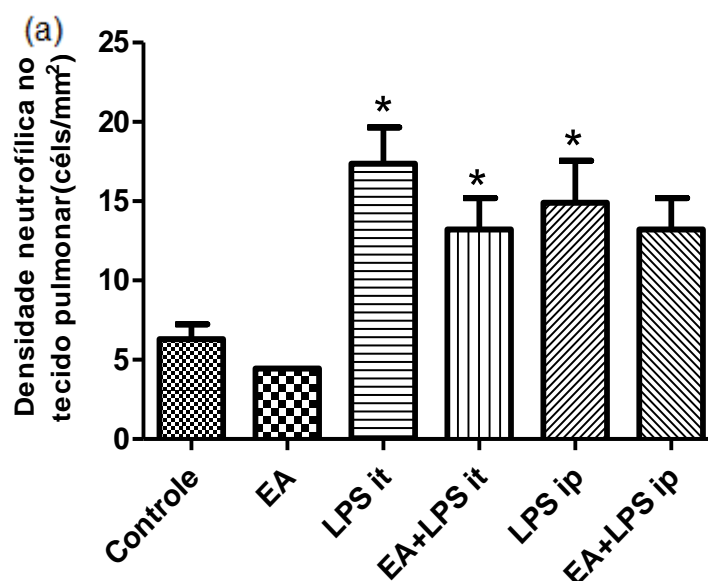


Figura 5. Densidade neutrofílica no parênquima pulmonar. Em (a) * indica efeito significativo do EA em reduzir a acumulação do conteúdo celular de PMN no tecido pulmonar no grupo LPS it ($p = 0,05$). A microfotografia ilustra a densidade de neutrófilos nos seis grupos: b = Co, c = EA, d = LPS it, e = EA + LPS it, f = LPS ip, g = EA + LPS ip. LPS lipopolissacarídeo; PMN, polimorfonucleares. EA- exercício aeróbio, LPS it - lipopolissacarídeo intratraqueal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal. Aumento de 100x.

4.6. Avaliação dos níveis de citocinas no LBA por ELISA

As amostras de LBA coletadas foram ensaiadas para IL-1 β , IL-6, CXCL1 / KC, IL-17, IFN- γ e TNF- α pelo ensaio imunoenzimático (ELISA).

Os resultados apresentados na Figura 6 demonstraram que o EA em animais submetidos à administração intratraqueal de LPS associado ao exercício aeróbio, reduziu significativamente o nível da citocina IL-1 β no LBA quando comparado ao grupo somente administração intratraqueal.

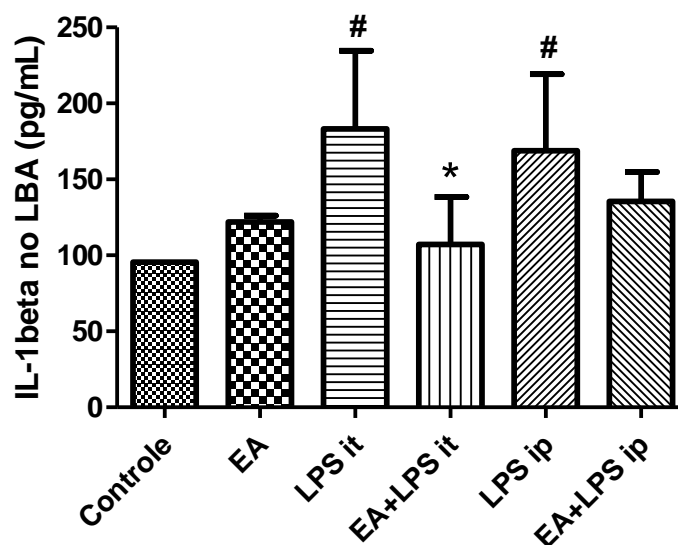


Figura 6. Efeitos do EA sobre o nível da citocina IL-1 β no LBA.

Efeitos do EA em um modelo experimental de SDRA induzida por LPS.

Nível da citocina IL-1 β no lavado broncoalveolar. * indica efeito significativo do EA em atenuar os efeitos do LPS sobre a expressão de IL-1 β ($p < 0,01$) comparado ao grupo LPS it. # indica efeito significativo do LPS em aumentar os níveis de IL-1 β ($p < 0,01$), comparado ao grupo controle. EA- exercício aeróbio, LPS it - lipopolissacarídeo intratraqueal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal.

Os resultados apresentados na Figura 7 demonstraram que o EA em animais submetidos à administração e aplicação de LPS associado ao EA, reduziu significativamente o nível da citocina IL-6 no LBA quando comparado ao grupo somente administração e aplicação de LPS ($p<0,001$).

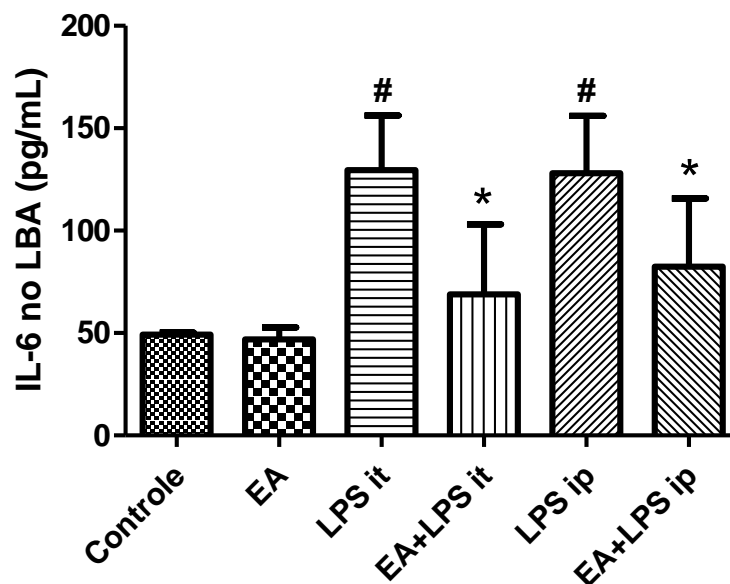


Figura 7. Efeitos do EA sobre o nível da citocina IL-6 no LBA.

Efeitos do EA em um modelo experimental de SDRA induzida por LPS.

Nível da citocina IL-6 no lavado broncoalveolar. * indica efeito significativo do EA em atenuar os efeitos do LPS sobre a expressão de IL-6, tanto para EA+LPS it, quanto para EA+LPS ip, comparado ao grupo controle ($p<0,001$). # efeito significativo de LPS em aumentar os níveis de IL-6, para os grupos LPS it e LPS ip ($p<0,001$). EA- exercício aeróbio, LPS it - lipopolissacarídeo intratraqueal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal.

Os resultados apresentados na Figura 8 demonstraram que o exercício aeróbio reduziu os níveis de CXCL1/KC no LBA, entretanto, os valores não foram significantes ($p>0,05$).

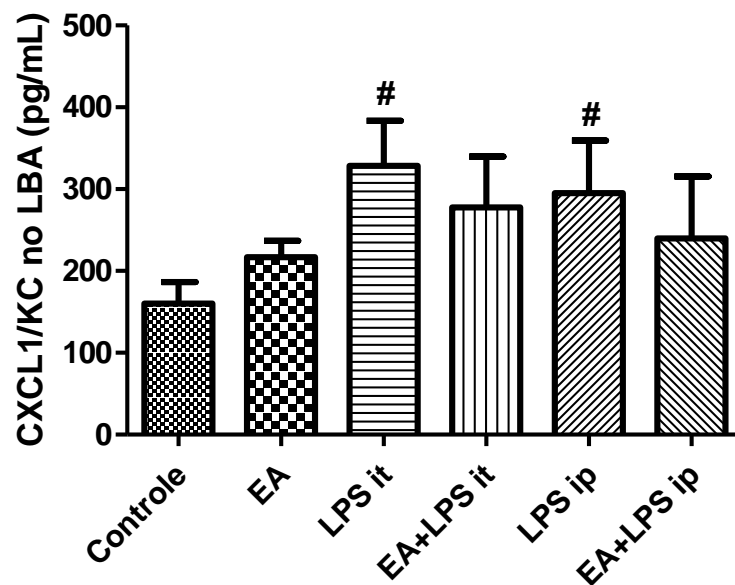


Figura 8. Efeitos do EA sobre o nível da citocina CXCL1/KC no LBA.

Efeitos do EA em um modelo experimental de SDRA induzida por LPS.

Nível da citocina CXCL1/KC no lavado broncoalveolar. # indica efeito significativo de LPS em aumentar o nível de CXCL1 / KC no LBA ($p<0,001$). EA- exercício aeróbio, LPS it - lipopolissacarídeo intratraqueal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal.

Os resultados apresentados na Figura 9 demonstraram que o EA em animais submetidos a administração intratraqueal de LPS associado ao exercício aeróbio, reduziu significativamente o nível da citocina IL-17 no LBA quando comparado ao grupo somente administração intratraqueal.

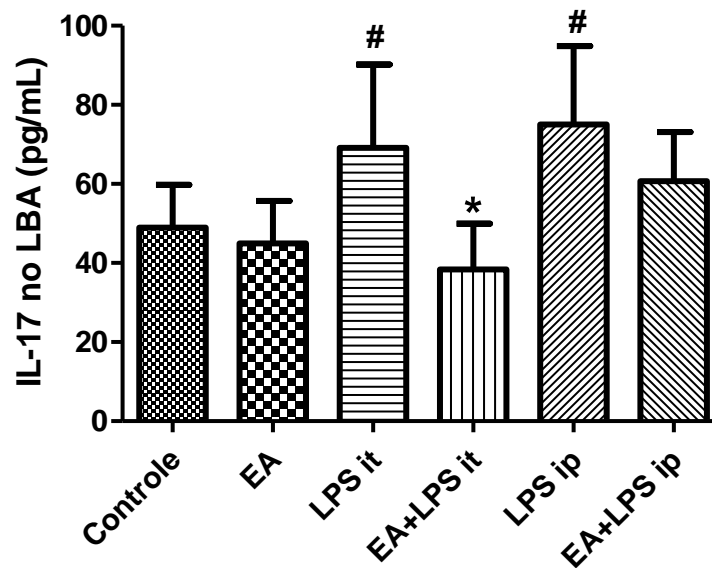


Figura 9. Efeitos do EA sobre o nível da citocina IL-17 no LBA.

Efeitos do EA em um modelo experimental de SDRA induzida por LPS.

Nível da citocina IL-17 no lavado broncoalveolar. * indica efeito significativo do EA em atenuar os efeitos do LPS sobre a expressão de IL-17 ($p < 0,01$) comparado ao grupo LPS it. # indica efeito significativo do LPS em aumentar os níveis de IL-1 β ($p < 0,01$), comparado ao grupo controle. EA- exercício aeróbio, LPS it - lipopolissacarídeo intratraqueal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal.

Os resultados apresentados na Figura 10 demonstraram que o EA em animais submetidos a administração intratraperitoneal de LPS associado ao exercício aeróbio, reduziu significativamente o nível da citocina IFN- γ no LBA ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo somente administração intraperitoneal.

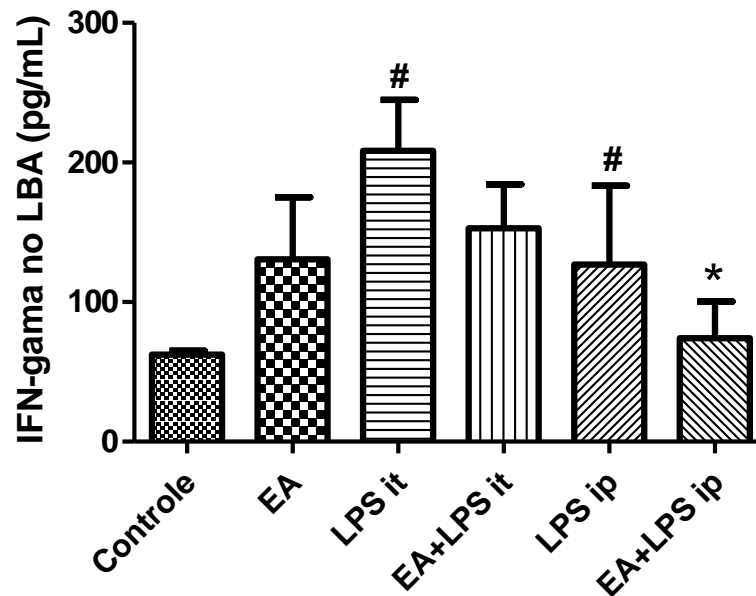


Figura 10. Efeitos do EA sobre o nível da citocina IFN- γ no LBA.

Efeitos do EA em um modelo experimental de SDRA induzida por LPS.

Nível da citocina IFN- γ no lavado broncoalveolar. * indica efeito significativo do EA em atenuar os efeitos do LPS sobre a expressão de IFN- γ ($p < 0,05$) comparado ao grupo LPS it. # indica efeito significativo do LPS em aumentar os níveis de IFN- γ ($p < 0,001$), comparado ao grupo controle. EA- exercício aeróbio, LPS it - lipopolissacarídeo intratraqueal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal.

Os resultados apresentados na Figura 11 demonstraram que o EA em animais submetidos a administração intratraperitoneal de LPS associado ao exercício aeróbio, reduziu significativamente o nível da citocina TNF- α no LBA ($p<0,05$) quando comparado ao grupo somente administração intraperitoneal.

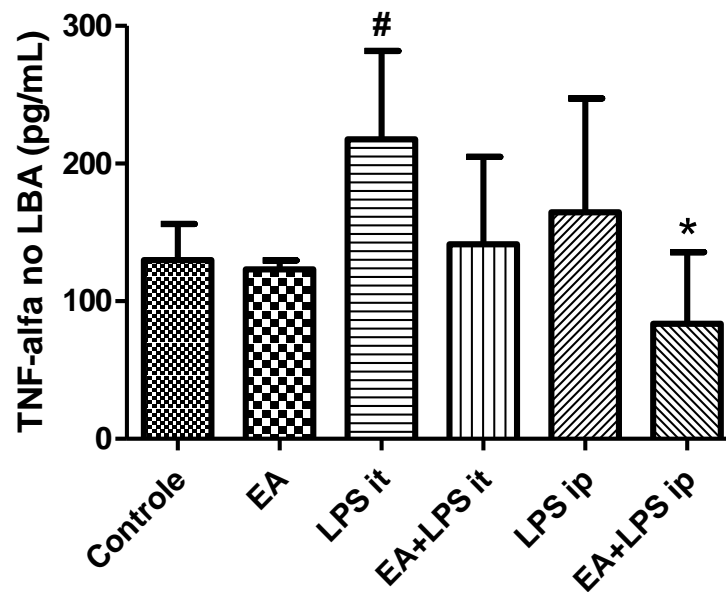


Figura 11. Efeitos do EA sobre o nível da citocina TNF- α no LBA.

Efeitos do EA em um modelo experimental de SDRA induzida por LPS.

Nível da citocina TNF- α no lavado broncoalveolar. * indica efeito significativo do EA em atenuar os efeitos do LPS sobre a expressão de TNF- α ($p<0,05$) comparado ao grupo LPS it. # indica efeito significativo do LPS em aumentar os níveis de TNF- α ($p<0,05$), comparado ao grupo controle. EA- exercício aeróbio, LPS it - lipopolissacarídeo intratraqueal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal.

4.7. Avaliação dos níveis de citocinas no soro por ELISA

As amostras de soro coletadas foram ensaiadas para IL-1 β , IL-6, CXCL1 / KC, IFN- γ e TNF- α pelo ensaio imunoenzimático (ELISA).

Os resultados apresentados na Figura 12 demonstraram que o EA em animais submetidos a administração intratracheal de LPS associado ao exercício aeróbio, reduziu significativamente o nível da citocina IL-1 β no soro ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo somente administração intratracheal.

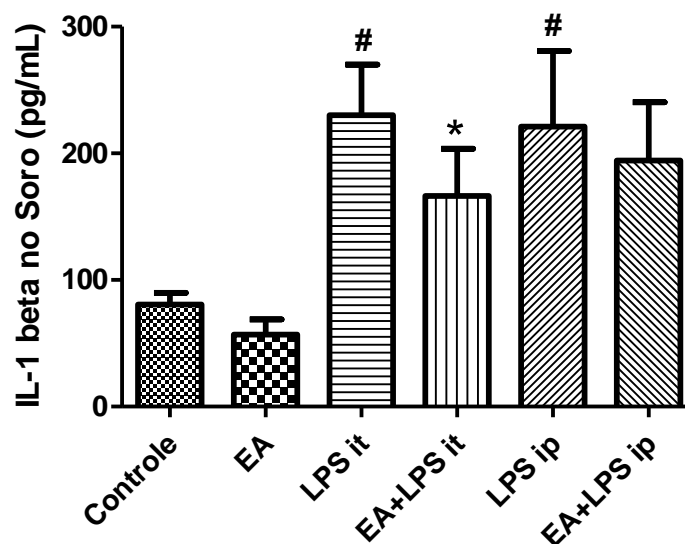


Figura 12. Efeitos do EA sobre o nível da citocina IL-1 β no soro.

Efeitos do EA em um modelo experimental de SDRA induzida por LPS.

Nível da citocina IL-1 β no soro. * indica efeito significativo do EA em atenuar os efeitos do LPS sobre a expressão de IL-1 β ($p < 0,05$) comparado ao grupo LPS it. # indica efeito significativo do LPS em aumentar o nível de IL-1 β ($p < 0,001$), comparados ao grupo controle. EA- exercício aeróbio, LPS it - lipopolissacarídeo intratracheal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal.

Os resultados apresentados na Figura 13 demonstraram que o EA em animais submetidos a administração intraperitoneal de LPS associado ao exercício aeróbio, reduziu significativamente o nível da citocina IL-6 no soro ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo somente administração intraperitoneal.

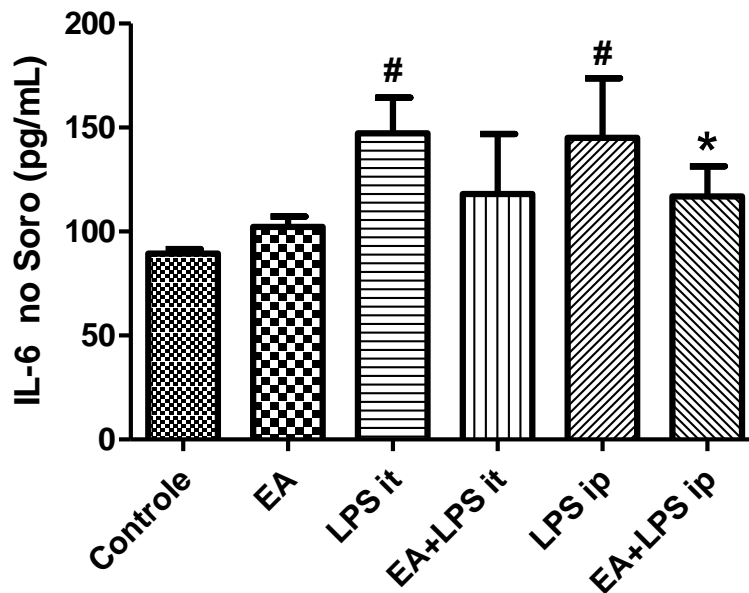


Figura 13. Efeitos do EA sobre o nível da citocina IL-6 no soro.

Efeitos do EA em um modelo experimental de SDRA induzida por LPS.

Nível da citocina IL-6 no soro. * indica efeito significativo do EA em atenuar os efeitos do LPS sobre a expressão de IL-6 ($p < 0,05$) comparado ao grupo LPS ip. # indica efeito significativo do LPS em aumentar o nível de IL-6 ($p < 0,001$), comparados ao grupo controle. EA- exercício aeróbio, LPS it - lipopolissacarídeo intratraqueal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal.

Os resultados apresentados na Figura 14 demonstraram que o EA em animais submetidos a administração intraperitoneal de LPS associado ao exercício aeróbio, reduziu significativamente o nível da citocina CXCL1/KC no soro ($p<0,05$) quando comparado ao grupo somente administração intraperitoneal.

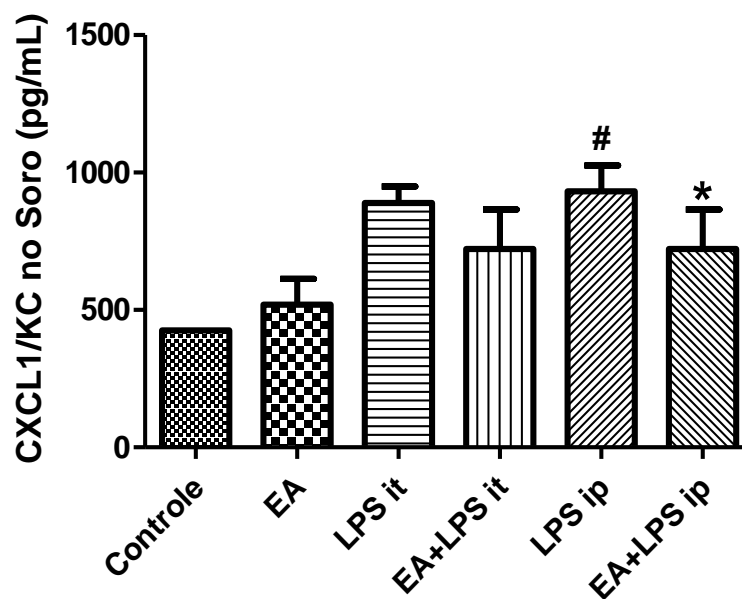


Figura 14. Efeitos do EA sobre o nível da citocina CXCL1/KC no soro.

Efeitos do EA em um modelo experimental de SDRA induzida por LPS.

Nível da citocina CXCL1/KC no soro. * indica efeito significativo do EA em atenuar os efeitos do LPS sobre a expressão de CXCL1/KC ($P<0,05$) comparado ao grupo LPS ip. # indica efeito significativo do LPS em aumentar o nível de CXCL1/KC ($p<0,05$), comparados ao grupo controle. EA- exercício aeróbio, LPS it - lipopolissacarídeo intratraqueal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal.

Os resultados apresentados na Figura 15 demonstraram que o exercício aeróbio reduziu os níveis de IFN- γ , entretanto, os valores não foram significantes ($p>0,05$).

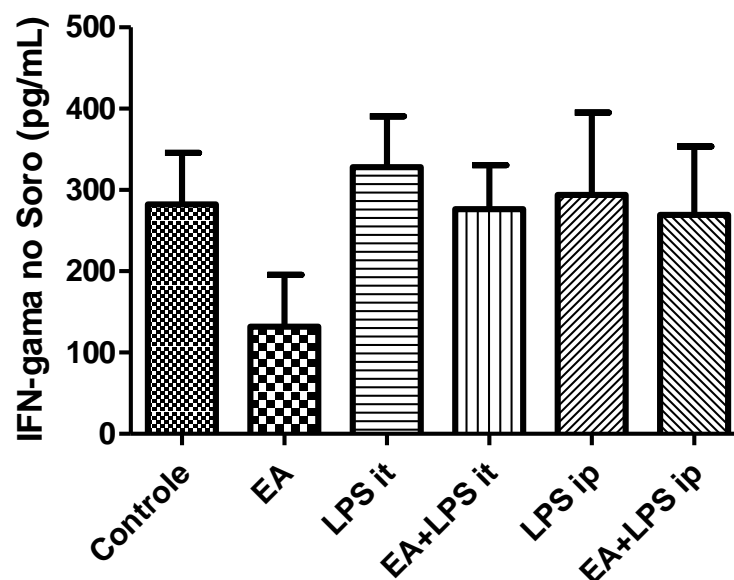


Figura 15. Efeitos do EA sobre o nível da citocina IFN- γ no soro.

EA- exercício aeróbio, LPS it - lipopolissacarídeo intratraqueal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal.

Os resultados apresentados na Figura 16 demonstraram que o EA em animais submetidos a administração intraperitoneal de LPS associado ao exercício aeróbio, reduziu significativamente o nível da citocina TNF- α no soro ($p<0,05$) quando comparado ao grupo somente administração intraperitoneal.

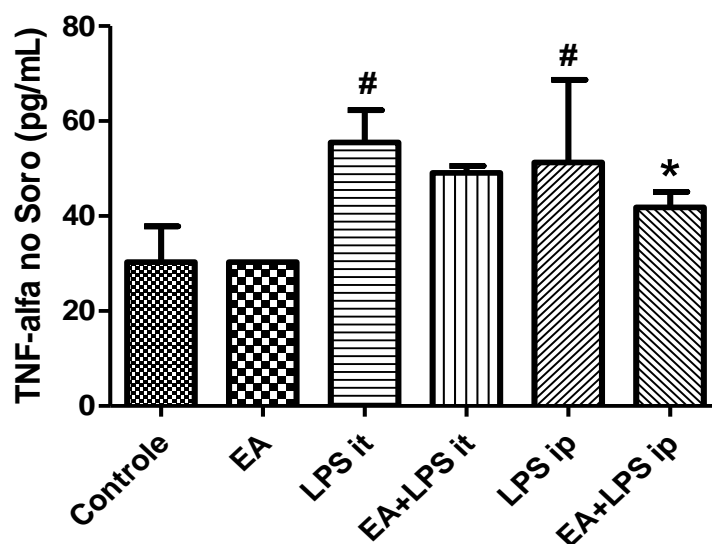


Figura 16. Efeitos do EA sobre o nível da citocina TNF- α no soro.

Efeitos do EA em um modelo experimental de SDRA induzida por LPS.

Nível da citocina TNF- α no soro. * indica efeito significativo do EA em atenuar os efeitos do LPS sobre a expressão de TNF- α ($p<0,05$) comparado ao grupo LPS ip. # indica efeito significativo do LPS em aumentar o nível de IL-6 ($p<0,01$), comparados ao grupo controle. EA- exercício aeróbio, LPS it - lipopolissacarídeo intratraqueal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal.

4.8. Avaliação do nível da citocina IL-10 no LBA e soro por ELISA

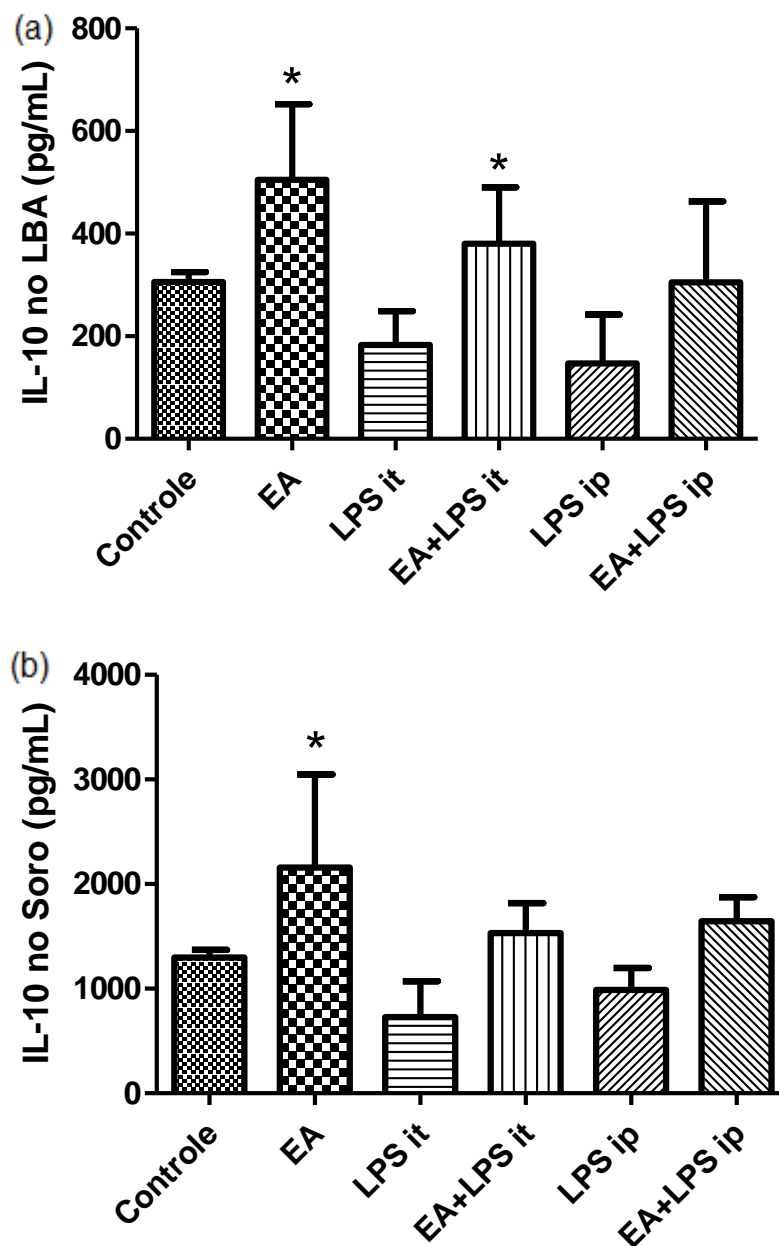


Figura 17. Efeitos do EA sobre o nível da citocina IL-10. Foram ensaiadas para IL-10 no LBA (a) e IL-10 no soro (b), pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Em (a) * indica efeito significativo do EA em aumentar os níveis de IL-10 LBA ($p < 0,01$) e em (b) * indica efeito significativo do EA em aumentar os níveis de IL-10 no soro (0,05). EA- exercício aeróbio, LPS it - lipopolissacarídeo intratraqueal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal.

4.9. Avaliação da expressão de TLR 4 nas proteínas dos pulmões

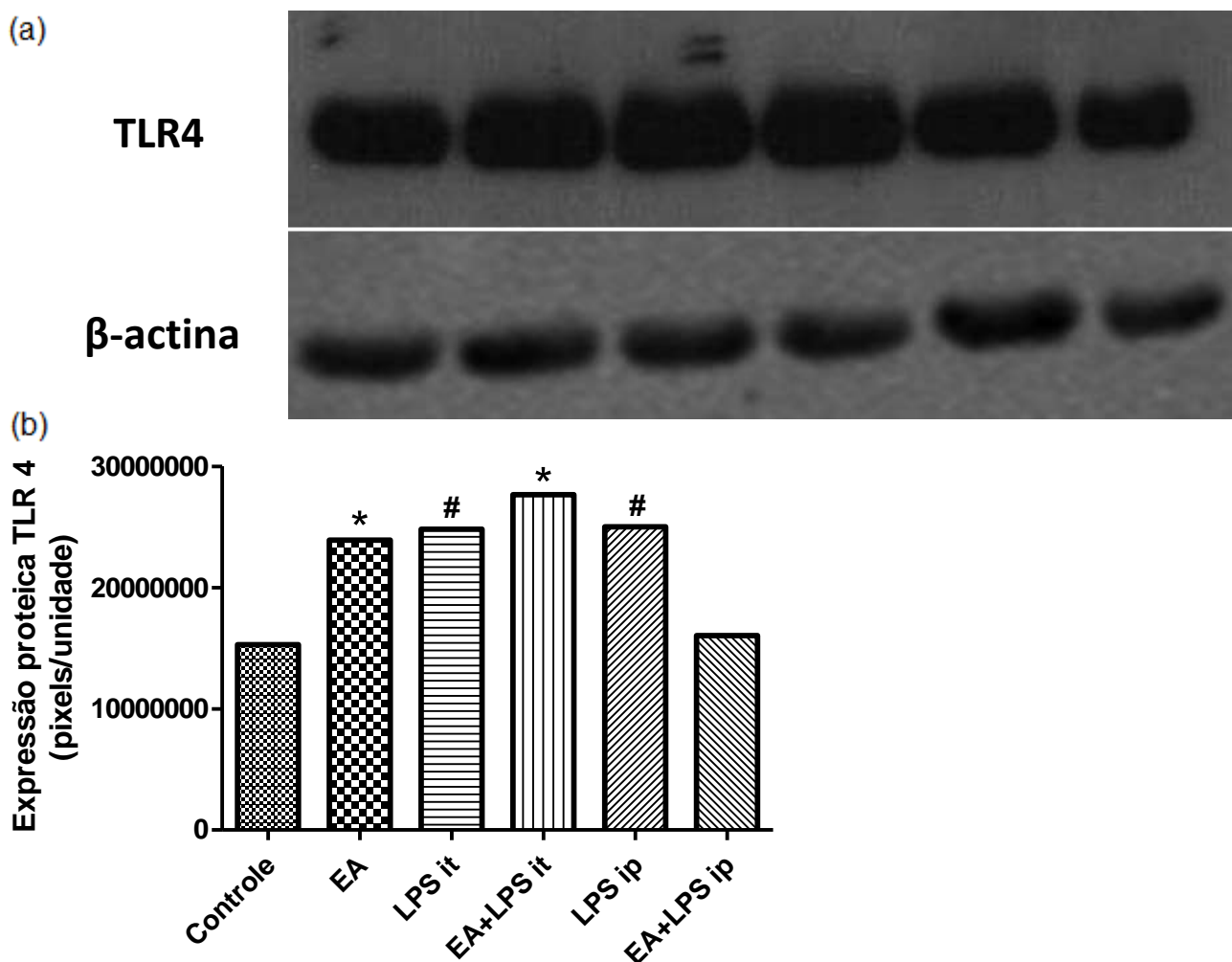


Figura 18. Efeitos do EA sobre a densidade relativa de TLR 4 no homogenato de pulmão. Em (a) níveis de proteína para TLR 4. Cada amostra foi composta por 50ug de proteína. Em (b) EA reduziu significativamente a expressão de TLR 4 em comparação aos grupos LPS it, avaliado por Western blotting ($p < 0,05$). EA- exercício aeróbio, LPS it - lipopolissacarídeo intratraqueal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal.

4.10. Avaliação da expressão de TLR 7 nas proteínas dos pulmões

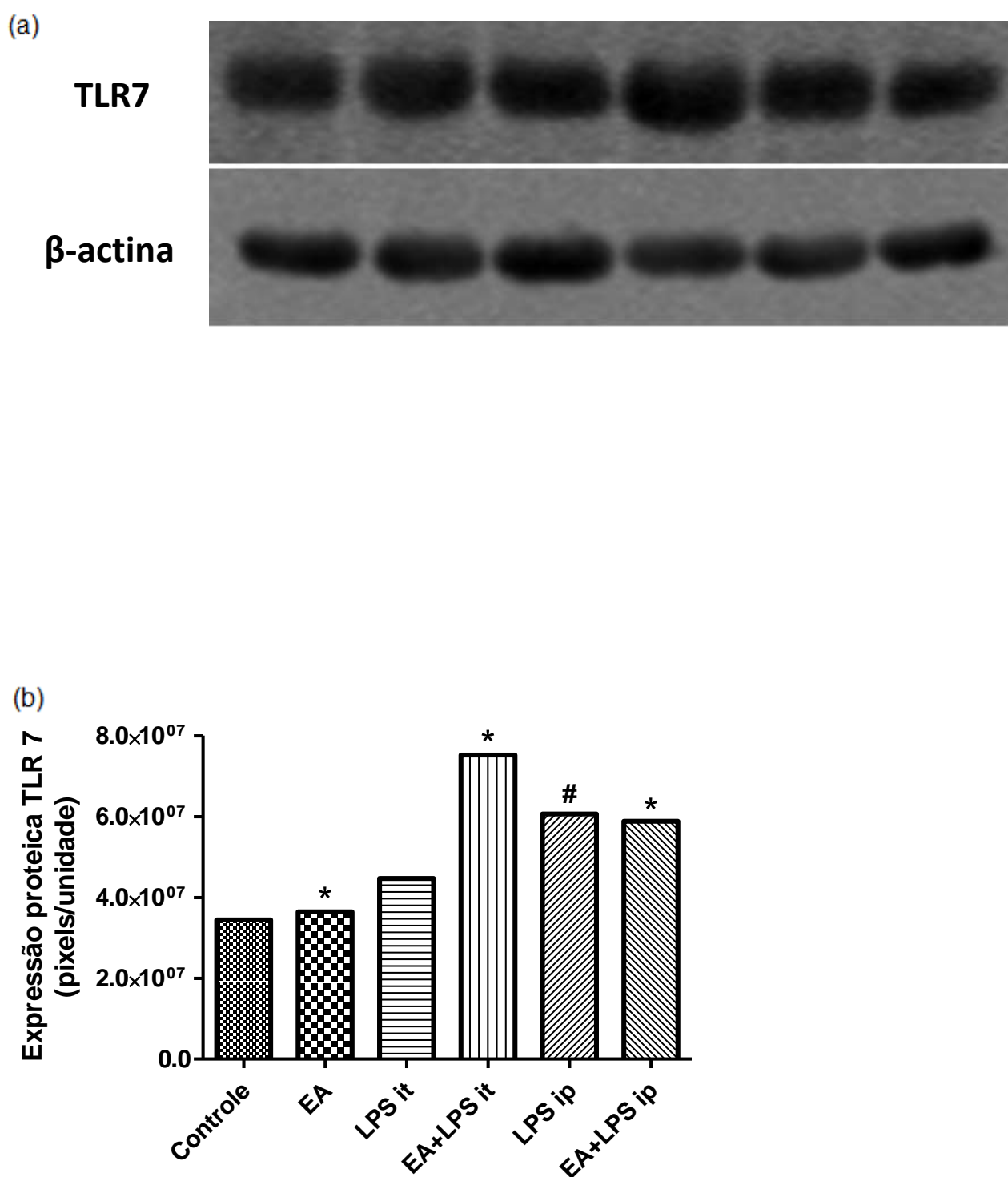


Figura 19. Efeitos do EA sobre a densidade relativa de TLR 7 no homogenato de pulmão. Em (a) níveis de proteína para TLR 7. Cada amostra foi composta por 50ug de proteína. Em (b) EA+LPS it apresentou aumento significativo quanto a expressão de TLR 7 em comparação ao grupo LPS it, avaliado por Western blotting ($p < 0,05$). EA- exercício aeróbio, LPS it - lipopolissacarídeo intratraqueal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal.

4.11. Avaliação da expressão de SOD nas proteínas dos pulmões

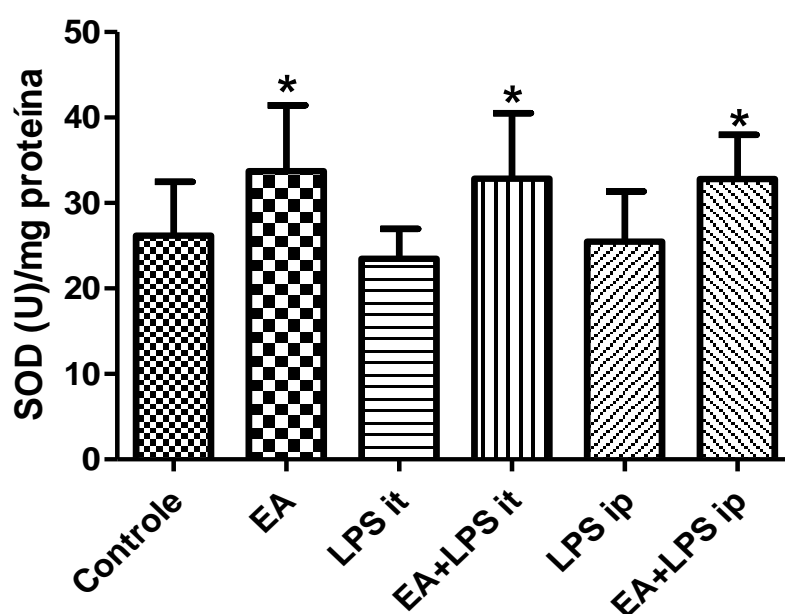


Figura 20. Efeitos do EA sobre a expressão total de SOD no homogenato de pulmão. EA apresentou aumento significativo quanto a expressão de SOD em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). O aumento também foi significativo nos grupos EA+LPS it e EA+LPS ip quando comparados à LPS it e LPS ip respectivamente. EA- exercício aeróbio, LPS it - lipopolissacarídeo intratraqueal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal.

4.12. Avaliação da expressão de Ânion nas proteínas dos pulmões

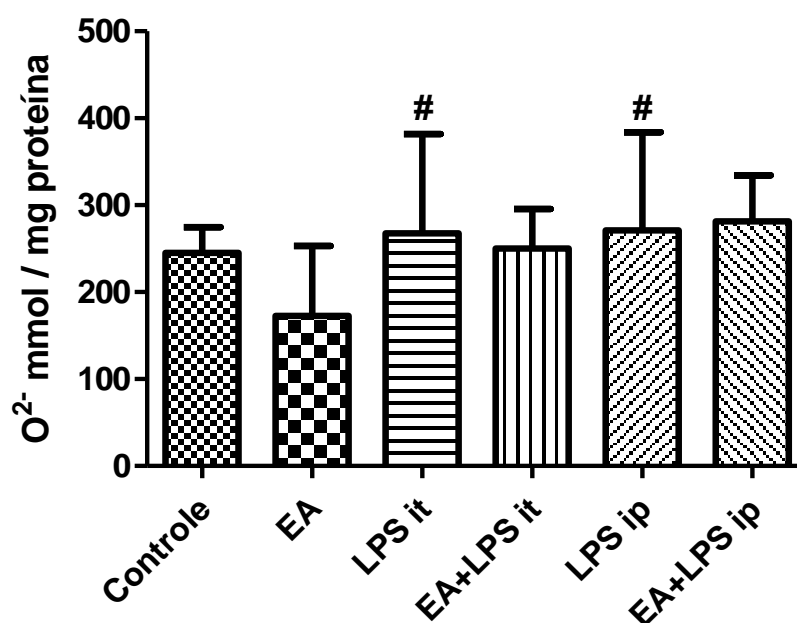


Figura 21. Efeitos do EA sobre a expressão total de ânion no homogenato de pulmão. Os grupos LPS it e LPS ip apresentaram aumentos significantes quanto à expressão de ânion em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). EA- exercício aeróbio, LPS it - lipopolissacarídeo intratraqueal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal.

4.13. Avaliação da expressão de QL nas proteínas dos pulmões

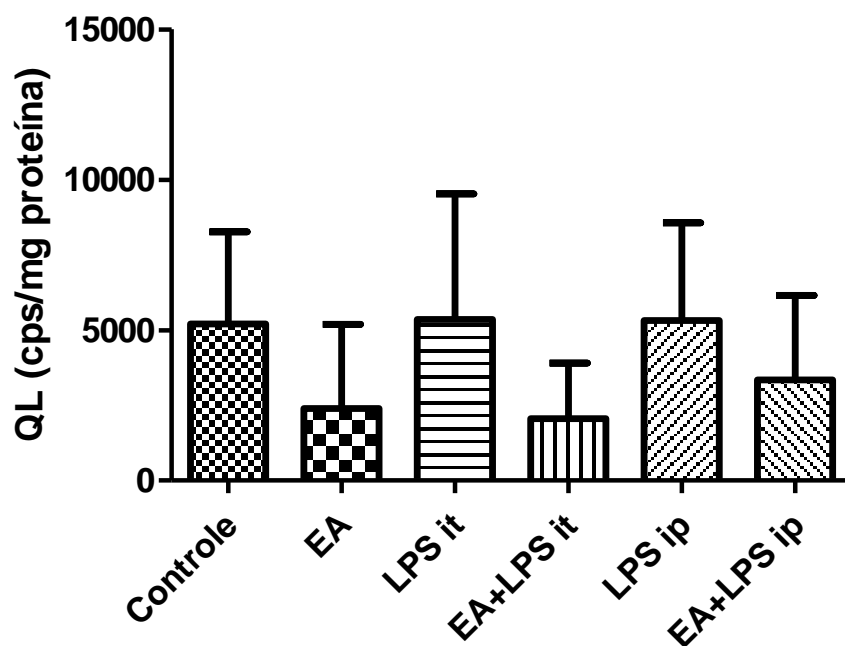


Figura 22. Efeitos do EA sobre a expressão de QL homogenato de pulmão. Os grupos submetidos à aplicação e administração de LPS apresentaram valores mais elevados quando comparados aos demais grupos, entretanto não foram significantes. EA- exercício aeróbio, LPS it - lipopolissacarídeo intratraqueal, LPS ip - lipopolissacarídeo intraperitoneal.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os mecanismos envolvidos nos efeitos protetores e antiinflamatórios do exercício aeróbio de intensidade moderada, realizado durante 4 semanas, previamente à indução da síndrome do desconforto respiratório agudo em modelos experimentais intrapulmonar e extrapulmonar, induzida pela administração e aplicação de LPS, respectivamente.

Os grupos submetidos à aplicação e administração de LPS apresentaram valores elevados de células totais no sangue e células totais e diferenciais no fluído do lavado broncoalveolar. Aumento no número de neutrófilos no parênquima pulmonar e elevados índices de citocinas pró-inflamatórias avaliados no fluído do lavado broncoalveolar e soro sanguíneo. Os nossos dados vão de encontro com alguns estudos já publicados anteriormente (RAMOS, 2010; REIS GONÇALVES, 2012).

A inflamação pulmonar foi avaliada através da acumulação neutrofílica nas células obtidas através do fluído do lavado broncoalveolar. Nossos resultados evidenciaram um aumento significativo nos dois grupos submetidos à indução da doença, sendo grupos LPS it e LPS ip. Em contrapartida, observamos uma redução importante e significativa nos grupos doentes associados ao exercício aeróbio de moderada intensidade. . As evidências ocorreram através da redução das células polimorfonucleares nos grupos experimentais que foram submetidos ao exercício aeróbio de moderada intensidade, realizado de forma isolada ou associado ao modelo experimental de síndrome do desconforto respiratório agudo, sendo eles EA+LPS it e EA+LPS ip.

Os dados apresentados em modelo intrapulmonar, reproduzido através da administração de LPS it, corroboram com dados obtidos em trabalho realizado por (REIS, 2010 e GONÇALVES, 2012). Entretanto, os dados

apresentados no atual trabalho, com a reprodução do modelo extrapulmonar não havia sido avaliado anteriormente. Sendo assim, atuam de forma favorável e contribuem de forma positiva para a introdução prévia do exercício aeróbio, a fim de favorecer a redução ou inibição parcial do processo inflamatório.

Importante ressaltar o papel dos neutrófilos na fase inicial do processo inflamatório. Seu acúmulo é presente na microvasculatura pulmonar, interstício e no espaço alveolar e pode favorecer para o aumento do processo inflamatório (WILLIAMS; CHAMBERS, 2014).

Através da técnica histomorfométrica, nosso estudo evidenciou um aumento significativo de neutrófilos no parênquima pulmonar em ambos os grupos doentes, mostrando uma evidência com a presença de tais células no processo agudo da lesão, indo de encontro com a evidência recente apresentada por (REIS, 2010 e GONÇALVES, 2012).

Os resultados também obtidos através dessa análise mostram que o exercício aeróbio de intensidade moderada quando associado à aplicação intratraqueal de LPS, foi capaz de promover a redução das células polimorfonucleares para o parênquima pulmonar quando comparado ao grupo que somente recebeu essa administração, corroborando com dados encontrados pelos autores acima citados. Os demais grupos apresentaram níveis reduzidos, porém os valores obtidos não foram significantes. Dessa maneira acreditamos que mais estudos deverão ser realizados, uma vez que poderia ser possível um benefício entre a associação do exercício aeróbio e o modelo de síndrome do desconforto respiratório agudo extrapulmonar.

Diversas citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α) têm sido descritas como importantes no processo fisiopatológico da SDRA (MATUTE-BELLO, et al., 2008). Muitos desses mediadores têm sido encontrados em níveis elevados nos LBA de pacientes com SDRA (SANTOS et al., 2006; MATUTE-BELLO et al., 2008; MATUTE-BELLO et al., 2011; RANIERI, 2012), coincidindo com os dados evidenciados nesse trabalho.

O presente trabalho apresentou redução significativa nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, avaliadas no fluído do lavado broncoalveolar e soro, nos grupos submetidos ao exercício aeróbio e também nos grupos doentes

associados ao exercício aeróbio, em contrapartida um aumento significativo nos grupos submetidos à administração e aplicação de LPS.

Especificamente para os níveis IL-1 β no LBA e soro, foi possível observar um aumento significativo nos grupos que foram submetidos à administração intratraqueal e aplicação intraperitoneal de LPS, com redução significativa para os animais dos dois grupos doentes associados ao exercício aeróbio de intensidade moderada. Esses resultados mostraram relação com dados evidenciados e apresentados por MUSSI, 2008.

Os níveis elevados de IL-6 foram evidenciados nos resultados apresentados, sendo esse aumento observado tanto no LBA, quanto no soro sanguíneo para ambos os grupos doentes. Os achados vão de encontro com outros trabalhos já realizados (MATUTE- BELLO et al., 2008; REIS GONÇALVES et al., 2012). No LBA foi possível notar uma redução significativa dos níveis de IL-6 nos grupos doentes associados ao exercício aeróbio.

Quanto aos dados obtidos pela análise no soro sanguíneo, essa redução foi evidenciada somente no grupo que recebeu a aplicação intraperitoneal de LPS, associado ao exercício aeróbio. Uma vez apresentados esses dados, se faz necessário a realização de novos trabalhos, afim de que se possa estabelecer a função dessa citocina diante da associação ao exercício aeróbio, pois dados apresentados por GONÇALVES et al., 2012 mostram aumento na expressão de IL-6 no tecido pulmonar para os grupos submetidos ao exercício aeróbio de baixa intensidade.

A resposta positiva obtida em nosso trabalho com a realização do exercício aeróbio de moderada intensidade, poderá de alguma forma favorecer a redução ou inibição do processo inflamatório em animais utilizados para a reprodução do modelo extrapulmonar.

Os níveis de CXCL1/KC apresentaram níveis elevados no fluído do lavado broncoalveolar em animais submetidos à administração e aplicação de LPS. Entretanto, quando associado ao exercício aeróbio, os dados não apresentaram valores significantes. Corroborando com dados obtidos no trabalho de (REIS GONÇAVES, 2012). Já para os níveis de CXCL1/KC no soro sanguíneo apresentou um aumento significativo somente para o grupo LPS ip, com redução significativa para o mesmo grupo associado ao exercício aeróbio.

A IL-17 apresenta um papel importante na ativação de células polimorfonucleares para o local da lesão, principalmente de neutrófilos. Os valores obtidos na dosagem de citocina IL-17 no fluído do lavado broncoalveolar apresentaram dados estatisticamente significantes nos grupos que receberam a instilação intratraqueal e aplicação intraperitoneal de LPS, favorecendo dessa maneira o aumento de neutrófilos, corroborando com afirmação de ativação de neutrófilos pela IL-17, demonstrada por AGGARWAL, 2002. Bem como, pode ter contribuído para o aumento da citocina IL-6 e CXCL1/KC.

A maior evidência quanto à presença de IFN- γ foi observada nos grupos doentes, avaliado pelo fluído do lavado broncoalveolar. Em contrapartida, a avaliação feita para essa mesma citocina, com a utilização do soro sanguíneo não apresentou resultados estatisticamente significantes.

Apresentados resultados que corroboram com estudo realizados, o nível de TNF- α avaliado para LBA e soro apresentaram valores aumentados e significantes comparados ao grupo controle, e quando associado ao exercício físico, seus resultados apresentaram um declínio significativo no grupos EA+LPS ip.

A utilização do exercício aeróbio de moderada intensidade realizada em nosso trabalho, foi capaz de promover um aumento significativo da IL-10 em amostras analisadas no fluído do lavado broncoalveolar e soro sanguíneo para o grupo que somente realizou a atividade física e o aumento também foi evidenciado no LBA de animais que receberam a administração intratraqueal de LPS associado ao exercício. Os demais grupos associado ao exercício apresentaram aumentos importantes no nível da IL-10, entretanto não mostraram dados estatisticamente significantes.

Uma vez evidenciado esse aumento, sabendo que a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e pode contribuir de forma a inibir a ação de outras citocinas pró-inflamatórias, os dados encontrados são de grande relevância para a inserção no tratamento prévio de pacientes predispostos ao desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório agudo.

Conforme afirmação de BEN, 2010, o TLR 4 apresenta papel importante no reconhecimento de LPS e na ativação da cascata inflamatória. Os resultados obtidos para a densidade protéica de TLR 4 nos grupos experimentais doentes

apresentaram valores elevados comparados ao grupo controle, entretanto o modelo de síndrome do desconforto respiratório agudo intrapulmonar associado ao exercício físico apresentou o maior valor comparado aos demais grupos. Os dados obtidos nos quais mostraram que os grupos LPS it e LPS ip apresentaram valores aumentados vão de encontro à dados já obtidos em outro trabalho (BEN, 2010). Entretanto, a elevação significativa do grupo EA+LPS it nos faz pensar que é necessário uma nova análise para confirmação de tal resultado, uma vez que o EA pode ter contribuído para esse aumento negativo.

A densidade protéica de TLR 7 obtida através do tecido pulmonar, evidenciou resultados aumentados em grupos praticantes de exercício aeróbio, seja ele de forma isolada ou mesmo em grupos que receberam a administração e aplicação de LPS associados ao exercício aeróbio. Em estudo realizado por YANO et al (2010), os autores demonstraram que o exercício exaustivo realizado em camundongos, foi capaz de reduzir TNF-alfa e produção de IFN-gama em resposta a R-848, através da modulação de TLR 7, ou seja, permitiu uma resposta inibitória na produção de citocinas pró-inflamatórias, mediado pela introdução do exercício aeróbio.

Um dos principais antioxidantes presente no pulmão é superóxido dismutase (SOD) Os resultados obtidos para a enzima antioxidante SOD, avaliado através de densidade protéica no tecido pulmonar, apresentaram resultados significantes para todos os grupos praticantes de exercício aeróbio de moderada intensidade. Esses resultados atuam de forma a complementar os efeitos benéficos do exercício aeróbio em sua prática regular. Os dados obtidos corroboram com dados obtidos por MUSSI, 2008.

Os dados encontrados para a densidade protéica de ânion mostram aumento significativo em ambos os grupos doentes quando comparados ao grupo controle. Os grupos LPS it e LPS ip quando associados ao exercício aeróbio, apresentaram valores reduzidos, entretanto não foram estatisticamente significantes. O mesmo é observado no grupo somente exercício aeróbio, que teve a densidade protéica de ânion reduzida quando comparada ao grupo controle. Dessa maneira torna-se essencial a realização de novos trabalhos, afim de que se possam elucidar os mecanismos diretos e indiretos envolvidos nas respostas anti-inflamatórias e anti-oxidantes.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstrou que a utilização do exercício aeróbio de intensidade moderada reduziu o impacto da síndrome do desconforto respiratório agudo experimental induzida por LPS, independente do modelo experimental utilizado, intrapulmonar ou extrapulmonar, e tais efeitos parecem ser mediados através da modulação do exercício aeróbio na redução do processo inflamatório, através da inibição de ativação e migração de células polimorfonucleares, principalmente de neutrófilos, inibição importante de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, CXCL1/KC e TNF- α) e secreção de citocinas anti-inflamatórias, especificamente a IL-10, na modulação de TLR4 e TLR7 e no aumento de antioxidantes no tecido pulmonar, especificamente SOD.

Com os resultados concluímos que a prática do exercício aeróbio de intensidade moderada exerce efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. Entretanto, como seus efeitos não foram positivos para todas as citocinas avaliadas, mais estudos se fazem necessários para elucidar os mecanismos antiinflamatórios, bem como para o entendimento de seus efeitos em modelos experimentais extrapulmonares.

7. ANEXOS

7.1. Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa no Uso de Animais (CEUA)



Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN0035.2013

Título do Projeto: Avaliação do Papel da IL-10 nos Efeitos Antiinflamatórios do Exercício Aeróbio na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo Experimental

Orientador: Rodolfo de Paula Vieira

Aluno: Nicole Cristine Rigonato de Oliveira

Objetivos: Avaliar os efeitos antiinflamatórios do TFA em um modelo experimental de síndrome do desconforto respiratório agudo sobre os níveis celulares intra e extrapulmonar, sobre a inflamação pulmonar no parênquima, sobre os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1beta, IL-6, CXCL1/KC, IL-10, TNF-alpha e IFN-gama) no LBA e soro e sobre a expressão dos Toll Like Receptors (TLRs) 2, 4, 7 e 9 no homogenato de tecido pulmonar e nos leucócitos recuperados do lavado broncoalveolar.

Métodos: Serão divididos em 6 grupos: Controle (Co): animais submetidos à 5 semanas de repouso, após este período receberão administração intratraqueal de NaCl 0,9%, e sacrificados 24 horas após esta administração; SDRA Intrapulmonar (SDRAIntra): animais submetidos à 5 semanas de repouso, após receberão administração intratraqueal de LPS E. Coli (10µg/animal), e sacrificados 24 horas após essa administração; SDRA Extrapulmonar (SDRAExtra): animais submetidos à 5 semanas de repouso, após receberão administração intraperitoneal de LPS E. Coli (100µg/animal), e sacrificados 24 horas após essa administração; Treinamento Físico Aeróbio (TFA): animais submetidos previamente ao treinamento físico aeróbio de intensidade moderada durante 5 semanas; Treinamento Físico Aeróbio (TFA) + SDRA Intrapulmonar (TFA+SDRAIntra): animais submetidos previamente ao treinamento físico aeróbio de intensidade moderada (60% da máxima capacidade física) durante 5 semanas, submetidos à administração intratraqueal de E. Coli LPS (10µg/animal), 24 horas após o término da última sessão e sacrificados 24 horas após essa administração; Treinamento Físico Aeróbio (TFA) + SDRA Extrapulmonar (TFA+SDRA): animais submetidos previamente ao treinamento físico aeróbio de intensidade moderada (60% da máxima capacidade física) durante 5 semanas, após receberão injeção intraperitoneal de LPS E. Coli (100µg/animal), e sacrificados 24 horas após essa administração. Após a administração de LPS, os animais serão individualizados para evitar contaminação cruzada.

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

Biotério de criação da UNINOVE.

Espécie	Linhagem	Idade	Peso aprox.	Quantidade		
				M	F	M+F
Camundongo isogênico	C57Bl/6	6 sem	20 gr	30		

Condições de alojamento e nutrição:

- o Alimentação: Acesso à ração Labina Purina *ad libitum*
- o Fonte de água: Acesso à água filtrada *ad libitum*

Lotação - Número de animais/área: 5 animais por caixa no biotério de manutenção da UNINOVE. Após a administração de LPS, os animais serão individualizados para evitar contaminação cruzada.

. Exaustão do ar: sim ou não: sim.

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

Fármaco	Ketamina/ Xilazina
Dose (UI ou mg/kg)	100mg/kg/ 10mg/kg
Via de administração	Intraperitoneal

Eutanásia:

Descrição	Sob anestesia, os animais serão eutanasiados rapidamente através da secção da artéria aorta abdominal.
Substância, dose, via	Ketamina/ Xilazina (100mg/kg/ 10mg/kg) respectivamente, Via Intraperitoneal.

Pertinência e valor científico do estudo proposto:

Este estudo será relevante, pois poderá servir como base para o esclarecimento dos benefícios antiinflamatórios causados pelo exercício físico para paciente portadores da síndrome do desconforto respiratório agudo

Um dos mais importantes mecanismos que determina a severidade da injúria pulmonar na SDRA é a magnitude da lesão da barreira epitelial. A possibilidade de reparar o epitélio num estágio precoce é o maior determinante da recuperação. Tratamentos específicos para acelerar o reparo do epitélio alveolar ainda não existem. Muitas das modalidades terapêuticas testadas atualmente baseiam-se na tentativa de diminuir a inflamação pulmonar para minimizar a lesão inicial. Sabendo-se que grande parte do processo inflamatório se dá pela ativação local e sistêmica de citocinas como TNF- α e IL-1 β e que exercícios aeróbicos de intensidade leve e moderada já têm demonstrado possuir efeito na diminuição destas citocinas via aumento da liberação de IL-10 nos pulmões, o presente projeto tem como hipótese

que: O TFA de intensidade moderada realizado previamente à indução de SDRA poderá resultar em uma menor resposta à injúria pulmonar. Avaliar se os efeitos anti-inflamatórios do TFA são mediados via IL-10 utilizando para isso camundongos C57Bl/6 em modelos experimentais de SDRA intra e extrapulmonar induzida por LPS. Avaliar se o TFA é capaz de modular a expressão de receptores *toll like* (TLRs) nos pulmões dos animais em modelos experimentais de SDRA intra e extrapulmonar induzida por LPS.

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

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

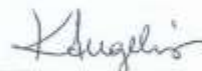
() Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

() Não-Aprovado

Comentário:

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

São Paulo, 26 de março de 2014



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

TRABALHO PREMIADO PELA SOCIEDADE EUROPÉIA RESPIRATÓRIA –
CONGRESSO INTERNACIONAL 2014 – MUNIQUE, ALEMANHA

EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY

GRANT

RESPIRATORY INFECTIONS ASSEMBLY TAKES GREAT PLEASURE IN AWARDING

Nicole Cristine Rigonato-Oliveira

THE ERS GRANT FOR BEST ABSTRACT IN BACTERIAL PNEUMONIA 2014

FOR THE ABSTRACT ENTITLED:
"AEROBIC EXERCISE DECREASES PULMONARY AND EXTRAPULMONARY LPS-INDUCED ARDS THROUGH IL-10 AND TLR-4
MODULATION"
PRESENTED AT THE 24TH INTERNATIONAL CONGRESS OF THE EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY
MUNICH, GERMANY (6-10 SEPTEMBER 2014)

every breath counts



ERS

EUROPEAN
RESPIRATORY
SOCIETY

Christoph Lange
Christoph Lange
Assembly Head



Kindly supported by *Basilea*

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, S., GURNEY, A. L. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. **J Leukoc Biol.** v. 71, p. 1-8, 2002.

BALAMAYOORAN, T., et al. Review: Toll-like receptors and NOD-like receptors in pulmonary antibacterial immunity. **Innate Immun.**, v.16, n.3, p.201-210, 2010.

BEN, D. F., et al., TLR 4 mediates lung injury and inflammation in intestinal ischemia-reperfusion. **J Surg Res.**, v. 174, n.2, p. 326-333, 2010.

BHATIA, M.; MOOCHHALA, S., Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. **J Pathol.**, v.202, n.2, p.145-156, 2004.

BROWNE, G.W.; PITCHUMONI, C.S. Pathophysiology of pulmonary complications of acute pancreatitis. **World J Gastroenterol.**, v.12, n.44, p.7087-7096, 2006.

BUSCH, G., et al., Coagulation factor Xa stimulates interleukin-8 release in endothelial cells and mononuclear leukocytes: implications in acute myocardial infarction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.25, p.461-466, 2004.

CERVANTES-BARRAGAN L. et al., Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell-derived type I interferon. **Blood.**, v. 109, p. 1131-1137, 2007.

CHEN, H. I., et al. Exercise training attenuates septic responses in conscious rats. **Med Sci Sports Exerc.**, v.39, n.3, p.435-442, 2007.

CHEN, D. Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines. **Immunol Rev.** v. 226, p. 80-86, 2008.

CHOW, C. W., HERRERA, M. T., SUZUKI, T., DOWNEY, G. P. Oxidative stress and acute lung injury. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 29, p. 427–431, 2003.

COSTA-ROSA, L. F. P. B.; VAISBERG, M. W. Influências do exercício na resposta imune. **Rev Bras Med Esp.**, v.8, n.4, p.167-172, 2002.

DE CUNHA, M. J., et al., The effect of exercise on the oxidative stress induced by experimental lung injury. **Life Sciences**, v. 92, p. 218–227, 2013.a

DE LUCA, D., et al., Clinical and biological role of secretory phospholipase A2 in acute respiratory distress syndrome infants. **Crit Care.**, v.17, n.4, R163, 2013.

DONNELLY, E. J. et al. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. **Lancet.** v. 341, p. 643-647, 1993.

FRANCO, R. F., et al., The in vivo kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation. **Blood**. V.96, n.2. p. 554-559, 2000.

FU, P. K., et al. Anti-inflammatory and anticoagulative effects of paeonol on LPS-induced acute lung injury in rats, **Evid Based Compl. Altern. Med.**, 2011.

GEISER, T. Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury – a translational approach. **Swiss Med WKLY.**, v.133, n.1, p.586-590, 2003.

GLEESON M., et al. Exercise and Toll-like receptors ,Running Head: Exercise and TLRs. **Exerc. Immunol. Rev.**, v.12, p.34-53, 2006.

GONZALEZ, F. B., LLESUY, S., BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radic Biol Med**. v. 10, p.93–100, 1991.

HAGAU, N. et al., Clinical aspects and cytokine response in severe H1N1 influenza A virus infection. **Crit Care**. v. 14, n.6, 2010. Epub 2010 Nov 9.

HE, Z., et al. Lipopolysaccharide induces lung fibroblast proliferation through Toll-like receptor 4 signaling and the phosphoinositide3-kinase-Akt pathway. **PLoS One.**, v.7, n. 4, 2012.

HE, Z, et al., Toll-like receptor 4 monoclonal antibody attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Exp Ther Med.**, v. 8, n.3, p. 871-876, 2014.

IPAKTCHI, K. et al., Attenuating burn wound inflammatory signaling reduces systemic inflammation and acute lung injury. **J Immunol.**, v.177, p.8065-8071, 2006.

IRIGOYEN, M. C., et al., Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. **Hypertension**. v.46, p.998–1003, 2005.

JIANG, D., et al. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. **Nat Med**. v. 11, p. 1173–1179, 2005.

KLEEBERGER, S. R., et al. Toll-like receptor 4 mediates ozone-induced murine lung hyperpermeability via inducible nitric oxide synthase. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. v. 280, p. 326–333, 2001.

KOLLS, J. K., LINDEN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**. v. 21, p.467–476, 2004.

KOVACH, M. A; STANDIFORD, T. J. Toll like receptors in diseases of the lung. **Int Immunopharmacol**. v. 11, n.10, p. 1399-1406, 2011.

KURDOWSKA, A. et al. Anti-interleukin-8 autoantibodies in patients at risk for acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Med.**, v.30, p. 2335- 2337, 2002.

LAFFERTY, E. I., QURESHI, S. T., SCHNARE, M. The role of toll-like receptors in acute and chronic lung inflammation. **J Inflamm.**, v. 7, p. 1-14, 2010.

LINDAUER, M. L., et al. Pulmonary inflammation triggered by ricin toxin requires macrophages and IL-1 signaling. **J Immunol.**, v.183, n.2, p.1419-1426. 2009.

LLESUY, S. F., et al. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. **Tumori.**, v.71, n.3, p. 241-249, 1985.

LOWRY, O. H. et al., Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.**, v. 193, n.1, p. 265-275, 1951.

MACHADO-ARANDA, D., et al. Increased phospholipase A2 and lyso-phosphatidylcholine levels are associated with surfactant dysfunction in lung contusion injury in mice. **Surgery.**, v.153, n.1, p.25-35, 2013.

MATSUGUCHI, T., et al. Gene expressions of lipopolysaccharide receptors, toll-like receptors 2 and 4, are differently regulated in mouse T lymphocytes. **Blood.**, v.95, p.1378–1385, 2000.

MATUTE- BELLO, G., et al. Animal models of acute lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v.295, n.3, p.379-399. 2008.

MATUTE-BELLO, G., et al. Acute Lung Injury in Animals Study Group. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v.44, n.5, p.725-738, 2011.

MAYNARD, C. L.; WEAVER, C. T. Diversity in the contribution of IL-10 to cell-mediated immune regulation. **Immunol. Rev.** v. 226, p. 219–233, 2008.

MCCORD, J. M., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin), **J Biol Chem.** v. 244, n. 22, p. 6049–6055, 1969.

MEDURI, G. U. et al. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 β and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time, **Chest.**, v.107, n.4, p. 1062–1073, 1995.

MENEGALI, B. T., et al. The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response. **Pulm Pharmacol Ther.**, v.22, p.567-573, 2009.

MOLDOVEANU, A. I., et al. The cytokine response to physical activity and training. **Sports Med.**, v.31, n.2, p.115-144, 2001.

MUÑOS, N. M., et al. Group V phospholipase A(2) increases pulmonary endothelial permeability through direct hydrolysis of the cell membrane. **Pulm Circ.**, v.2, n.2, p.182-192, 2012.

MUSSI, R. K., et al. Exercise training reduces pulmonary ischaemia-reperfusion-induced inflammatory responses. **Eur Respir J.**, v.31, n.3, p.645-649, 2008.

OLIVEIRA-JUNIOR, M. C., et al. Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS. **J Photochem Photobiol B.**, v.134C, p.57-63, 2014.

OLIVO, C. R., et al., Effects of aerobic exercise on chronic allergic airway inflammation and remodeling in guinea pigs. **Resp Phys & Neurob**, v. 182, p. 81-87, 2012.

PASTVA, A., et al. Aerobic exercise attenuates airway inflammatory responses in a mouse model of atopic asthma. **J Immunol.**, v.172, n.7, p.4520-4526, 2004.

PASTVA, A., et al. RU486 blocks the anti-inflammatory effects of exercise in a murine model of allergen-induced pulmonary inflammation. **Brain Behav Immun.**, v.19, n.5, p.413-422, 2005.

PEDERSEN, B. K.; TOFT, A. D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. **Br J Sports Med.**, v.34, n.4, p.246-251, 2000.

PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol.**, v. 98, p. 1154-1162, 2005.

QURESHI, S. T., et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (TLR4) **J Exp Med.** v. 189, n. 4, p. 615-625, 1999.

QURESHI, S. T., et al. Inducible activation of TLR4 confers resistance to hyperoxia-induced pulmonary apoptosis. **J Immunol.** v. 176, p. 4950–4958, 2006.

RAMOS, D.S., et al. Low-Intensity Swimming Training Partially Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 42, n.1, p. 113-119, 2010.

RANDHAWA, R., BELLINGAN, G. Acute lung injury. **Anaesth Intensive Care Med.** v. 8, n.11, p.477–480, 2007.

RANIEIR, V. M., et al. ARDS Definition Task Force, Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. **JAMA.**, v.307, n.23, p.2526-2533, 2012.

RAYMONDOS, K., et al. Early alveolar and systemic mediator release in patients at different risks for ARDS after multiple trauma. **Injury.**, v.43, n.2, p.189-195, 2012.

REIS GONÇALVES, C. T., et al. Protective effects of aerobic exercise on acute lung injury induced by LPS in mice. **Crit Care.**, v.16, n.5, R199, 2012.

REISS, L. K., UHLIG, U., UHLIG, S. Models and mechanisms of acute lung injury caused by direct insults. **Eur J Cell Biol.** v. 91, n. 6-7, p. 590-601, 2012.

SANTOS, F. B., et al. Time course of lung parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. **J Appl Physiol.**, v.100, n.1, p.98-106, 2006.

SILVA, R. A., et al. Aerobic training reverses airway inflammation and remodeling in asthma murine model. **Eur Respir J.**, v. 35, n.5, p. 994-1002, 2010.

SILVA, A.C., et al., Exercise Inhibits Allergic Lung Inflammation. **Intern J of Sports Med**, v. 33, p. 402-409, 2012.

SILVA, R. A. et al., Airway remodeling is reversed by aerobic training in a murine model of chronic asthma. **Scand J Med Sci Sports.** 2014.

SINGH, G. et al., Incidence and evolution of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in the surgical intensive care unit. **Ind J of Critical Care Med.**, v.18, n.10, p.659-665, 2014.

SMUDA, C., et al. TLR-induced activation of neutrophils promotes histamine production via a PI3 kinase dependent mechanism. **Immunol Lett.**, v.141, n.1, p.102-108, 2011.

THIMMULAPPA, R. K., et al., Nrf2-dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolidine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.351, p. 883–889, 2006.

TOLEDO, A. C. et al. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. **Eur Respir J.**, v.39, n.2, p.254-264, 2012.

VIEIRA, R. P., et al. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. **Am J Respir Crit Care Med.**, v.176, n.9, p.871-877, 2007.

VIEIRA, R. P., et al. Aerobic conditioning and allergic pulmonary inflammation in mice. II. Effects on lung vascular and parenchymal inflammation and remodeling. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v.295, n.4, p.670-679, 2008.

VIEIRA, R. P. et al. Airway epithelium mediates the anti-inflammatory effects of exercise on asthma. **Respir Physiol Neurobiol.**, v.175, n.3, p.383-389, 2011.

VIEIRA, R. P. et al. Anti-Inflammatory Effects of Aerobic Exercise in Mice Exposed to Air Pollution. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 44, n.7, p.1227-1234, 2012.

VIEIRA, R. P., et al., Exercise Deactivates Leukocytes in Asthma, **Intern J of Sports Med**, v. 35, p. 629-635, 2013.

YANG, Y.; CHEN, S.; GE, X. Role of interleukin-18 in the development of acute pulmonary injury induced by intestinal ischemia/reperfusion and its possible mechanism. **Gastroenterology**. v. 22, p. 253-260, 2007

YANO, H. et al., Exhaustive exercise reduces TNF- α and IFN- α production in response to R-848 via toll-like receptor 7 in mice. **Eur J Appl Physiol.**, v.110, n.10, p.797-803, 2010.

ZIEKER, D., et al. CDNA-microarray analysis as a research tool for expression profiling in human peripheral blood following exercise. **Exerc Immunol Rev.**, v.11, p.86-96, 2005

WALKEY, A. J. et al., Acute respiratory distress syndrome: epidemiology and management approaches. **Clin Epidemiol.**, v. 4, p. 159–169, 2012.

WARE, L. B, MATTHAY, M. A. The acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**,v. 342, p.1334–1349, 2000.

WILLIAMS, A. E. ; CHAMBERS, R. C., The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS?. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. v. 306, p. 217-230, 2014.