

Paulo Rogério Pereira

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO NA FIBROSE
PULMONAR**

Universidade Nove de Julho
São Paulo
2014

Paulo Rogério Pereira

EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO NA FIBROSE PULMONAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação a Universidade Nove de Julho, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Orientador: Prof.Dr.Rodolfo de Paula Vieira

Universidade Nove de Julho
São Paulo
2014

Pereira, Paulo Rogério.

Efeitos do treinamento físico aeróbico na fibrose pulmonar. /Paulo
Rogério Pereira. 2014.

57 f.

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

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

1. Interstício. 2. Inflamação. 3. Bleomicina e exercício.

I. Vieira, Rodolfo de Paula. II. Título

CDU 615.8

São Paulo, 15 de dezembro de 2014.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): PAULO ROGERIO PEREIRA

Titulo da Dissertação: "EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO NA FIBROSE PULMONAR"

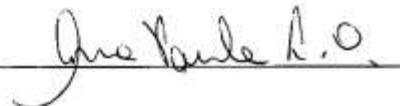
Presidente: PROF. DR. RODOLFO DE PAULA VIEIRA



Membro: PROAF. DRA. CARLA MÁXIMO PRADO



Membro: PROFA. DRA. ANA PAULA LIGEIRO DE OLIVEIRA



Dedico à DEUS esta dissertação e aos meus exemplos de vida, de união, amor incondicional, de respeito, de luta e conquistas, meus preciosos pais, Dalva Florêncio Pereira (in memorian) e José dos Santos Pereira que sempre me estimularam com muito discernimento, bom senso, amor e dedicação. E a minha querida Sheila Cristina de Souza e filhas Nataly Matias de Lima Pereira e Amanda Matias de Lima Pereira que estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis. Minha gratidão não cabe em palavras. Dedico também a meu Tio Nelson Florêncio (in memorian), pelo amor e companheirismo, e que me foram fontes de inspiração para meu crescimento. Obrigada por tudo, amo vocês incondicionalmente.

Agradecimentos

A DEUS toda glória.

E agradeço a ti Senhor pela maravilhosa família.

Minhas filhas Nataly e Amanda pela paciência. Amo vocês!

Ao Prof.Dr.Rodolfo de Paula Vieira meu orientador, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade, por todo empenho imensurável, exemplo de sabedoria, compreensão, seriedade, competência, amizade e confiança, objetividade. Que Deus te dirija aos mais altos caminhos sempre na presença dele.

A Profa. Ana Paula Ligeiro de Oliveira, pelos ensinamentos e apoio. Que Deus a guie também. Agradeço pelo apoio e dedicação.

Ao Prof.Dr. Humberto Dellê, ao Prof.Dr.Luis Vicente Franco de Oliveira Mônica e Profa.Dra. Cláudia Santos Oliveira aos quais tenho profunda admiração pela competência e seriedade profissional.

Aos meus amigos: Manoel, Adilson, Ricardo, Jefferson, Gabriel, Yves e amigas: Vanessa, Nicole, Flávia, Léia, Ana Roberta muito obrigado por tudo. Que Deus os guie para uma grande carreira de Bênçãos sobre seu comando.

Às técnicas e amigas, Ângela e Luciana pelo apoio e amizade fundamental e excelência profissional.

A todos que colaboraram e à banca examinadora, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 História da Fibrose Pulmonar Idiopática	1
1.2 Definição do Interstício	2
1.3 Doença Intersticial Pulmonar	2
1.4 Fibrose Pulmonar Idiopática	4
1.5 Patogênese da Fibrose Pulmonar Idiopática	5
1.6 Fibras colágenas e remodelamento	6
1.7 Produção de substância surfactante	9
1.8 Alterações funcionais	10
1.9 Serotonina	12
1.10 Treinamento físico aeróbio (TFA) para doenças pulmonares crônicas	13
1.11 Bleomicina	14
1.12 Reabilitação Pulmonar	16
1.13 Justificativa	19
2 OBJETIVOS	19
2.1 Gerais	19
2.2 Específicos	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20

3.1	Animais e grupos experimentais	20
3.2	Modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina	20
3.3	Teste físico e treinamento físico aeróbio em esteira	21
3.4	Avaliação da inflamação pulmonar	21
3.5	Avaliação do remodelamento	22
3.6	Avaliação dos níveis de citocinas no lavado broncoalveolar (LBA)	
3.7	Avaliação dos níveis de serotonina (5-HT), 5-HT _{2B} , Akt total e fosforilada	22
3.8	Análise Estatística	23
4 RESULTADOS		24
Artigo submetido para o International Journal of Sports Medicine		24
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS		43
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		44
7 ANEXO		50
7.1	Documentos de aprovação no Comitê de Ética Experimental Animal da Universidade de São Paulo	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LBA –	Lavado Bronco-Alveolar
CPT –	Capacidade Pulmonar Total
CRF –	Capacidade Residual Funcional
CVF –	Capacidade Vital Forçada
DIP –	Doença Intersticial Pulmonar
DLCO –	Difusão do Monóxido de Carbono
DPOC –	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
FGE –	Fator de Crescimento Epidérmico (epidermal growth factor)
FGF –	Fator de crescimento fibroblástico (Fibroblast growth factor)
FPI –	Fibrose Pulmonar Idiopática
G-CSF –	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (granulocyte-colony stimulating factor)
IFN-gama –	Interferon-gama
IL-1 –	Interleucina-1
IL-10 –	Interleucina-10
IL-13 –	Interleucina-13
IL-4 –	Interleucina-4
IL-6 –	Interleucina-6
IL-8 –	Interleucina-8
IL-9 –	Interleucina-9

PaCo2 –	Pressão Parcial de Dióxido de Carbono no Sangue Arterial
PaO2 –	Pressão Parcial de Oxigênio no Sangue Arterial
PBS –	Tampão Fosfato
PI –	Pneumócito tipo I
PII –	Pneumócito tipo II
SDRA –	Síndrome do Desconforto Respiratória Agudo
SP-A –	Proteína Surfactante A (surfactant protein A)
SP-D –	Proteína Surfactante D (surfactant protein D)
TGF-β –	Fator de crescimento transformante-β (transforming growth factor-β)
TNF –	Fator de necrose tumoral (tumor necrosis factor)
VEF1 –	Volume Expiratório Forçado de Primeiro Segundo da Capacidade Vital
VR –	Volume Residual

Resumo

Introdução: A fibrose pulmonar idiopática (FPI) é uma doença devastadora com pobre prognóstico e nenhum tratamento efetivo disponível. Estudos recentes demonstram que a serotonina / 5-hidroxitriptamina (5-HT) desempenha um papel importante no processo de fibrose pulmonar. Entretanto, alguns estudos demonstram que o tratamento não farmacológico, como programas de reabilitação pulmonar para pacientes com FPI resulta em melhora da qualidade de vida e do manejo da doença, mas os efeitos sobre os pulmões e os possíveis mecanismos desses efeitos não são conhecidos. **Objetivos:** Portanto, o presente estudo investigou os efeitos do treinamento físico aeróbio na resposta pulmonar em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos, e os possíveis efeitos moduladores do exercício sobre os níveis de 5-HT. **Materiais e métodos:** Foram utilizados setenta e dois camundongos machos C57/Bl6, os quais foram distribuídos em Controle (Co), Exercício (Ex), Fibrose (Fi) e Fibrose + Exercício (Fi + Ex). Vinte e quatro horas após o último teste físico na esteira, a inflamação pulmonar foi avaliada através da avaliação do lavado broncoalveolar (contagem de células e medidas de citocinas: IL-1beta, IL-6, CXCL1/KC, IL-10, TNF-alfa, TGF-beta), e o remodelamento pulmonar através do acúmulo de fibras colágenas no parênquima pulmonar. Foram avaliados também os níveis de 5-HT no sobrenadante do lavado broncoalveolar e no soro. Além disso, a expressão do receptor para 5-HT (5-HT2B) também foi avaliado no tecido pulmonar. Por fim, a expressão da forma integral e fosforilada da Akt também foi avaliada no tecido pulmonar. **Resultados:** Os resultados demonstraram que o treinamento aeróbio reduziu o número de células totais ($p<0.001$), de neutrófilos ($p<0.01$), de

macrófagos ($p<0.01$) e de linfócitos ($p<0.05$) no lavado broncoalveolar, assim como reduziu os níveis de IL-1beta ($p<0.01$), IL-6 ($p<0.05$), CXCL1/KC ($p<0.001$), TNF-alfa ($p<0.001$) e TGF-beta ($p<0.001$) no lavado broncoalveolar, enquanto aumentou os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 ($p<0.001$). O treinamento físico também reduziu a deposição de fibras de colágeno no parênquima pulmonar ($p<0.001$). Os níveis de 5-HT no sobrenadante do lavado broncoalveolar ($p<0.001$) e no soro ($p<0.05$) e a expressão do receptor 5HT2B ($p<0.01$) no tecido pulmonar demonstraram-se reduzidos no grupo submetido ao treinamento físico. A expressão de Akt na forma total não foi alterada pelo treinamento físico, enquanto que a forma fosforilada foi reduzida pelo treinamento físico ($p<0.01$). **Conclusões:** Os resultados do presente estudo demonstram claramente que o treinamento físico aeróbio é capaz de reduzir a inflamação e a fibrose pulmonar em um modelo experimental de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina. Os resultados também demonstram que pelo menos em parte, esses efeitos benéficos do treinamento físico aeróbio pode ter sido mediado pelo aumento da liberação de IL-10, assim como pela redução da exacerbação dos níveis de serotonina, levando a uma redução da expressão do receptor de serotonina 5-HT2B, e também da redução da ativação da proteína Akt.

Abstract

Background: Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is characterized by decline of lung function, increased inflammation and fibrosis mainly in the pulmonary interstitium, with serotonin (5-HT) and Akt signaling presenting a role. Aerobic training (AT) reduces lung injury in different models of pulmonary diseases.

However, the mechanisms underlying the effects of AT in a model of bleomycin-induced lung fibrosis is unknown. Thus, this study investigated the effects of AT in a model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis, as well as the participation of 5HT/Akt signaling. Methods: Seventy-two C57Bl/6 male mice were distributed in Control (Co), Exercise (Ex), Fibrosis (Fi) and Fibrosis+Exercise (Fi+Ex) groups. Bleomycin (1.5UI/Kg) was administered on day 1 and treadmill AT began on day 14 during 4 weeks. Total and differential cells count in bronchoalveolar lavage (BAL), IL-1beta, IL-6, CXCL1/KC, IL-10, TNF-alpha and TGF-beta levels in BAL fluid, collagen content in the lung parenchyma, 5-HT levels in BAL fluid and in serum, and the expression of 5-HT2b receptor and Aktphosphorylation were evaluated. Results: AT reduced bleomycin-increased number of total cells ($p<0.001$), neutrophils ($p<0.01$), macrophages ($p<0.01$) and lymphocytes ($p<0.05$) in BAL. AT also reduced the levels of IL-1beta ($p<0.01$), IL-6 ($p<0.05$), CXCL1/KC ($p<0.001$), TNF-alpha ($p<0.001$) and TGF-beta ($p<0.001$), while increased the levels of IL-10 ($p<0.001$). Collagen fibers deposition was also reduced by AT ($p<0.01$). These findings were followed by AT-reduced bleomycin-increased 5-HT levels in BAL fluid ($p<0.001$) and in serum ($p<0.05$), as well as the expression of 5-HT2b receptor ($p<0.01$) and the Aktphosphorylation in lung tissue. Conclusions: We conclude that AT reduces lung inflammation and fibrosis in a model of bleomycin-induced lung fibrosis involving 5-HT/Akt signaling.

Key words: idiopathic pulmonary fibrosis, exercise immunology, physical training, serotonin, cytokines.

1 INTRODUÇÃO

1.1 História da Fibrose Pulmonar Idiopática

O termo Cirrose Pulmonar vem de 1897, descrita por Rindfleish após um caso de fibrose pulmonar difusa bilateral, que se superpõe ao que conhecemos hoje como Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI). Em 1915, foram descritos 5 casos de uma doença pulmonar semelhante, com um início clínico inaparente, com caráter progressivo e incurável, em pessoas de meia idade, chamado de a doença de linfangite reticular dos pulmões, descrito por Von Hanseman (1).

Em 1960, em sua tese Eduardo Mac-Clure, Professor da Faculdade Nacional de Medicina da Universidade do Brasil e da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, cita sobre “Cirrose Pulmonar”, para antiga cátedra patologia da universidade do Brasil, o registro de que a doença apresentava numerosas formas e multiplicidade etiológica e complexidades patogênicas fazem com que, não raramente surjam dificuldades em classificá-las. Após todos estes anos de trabalhos individuais ou de grupos isolados no estudo da fibrose pulmonar idiopática, foi formada uma comissão de especialistas (ATS/ERS) na área de doença intersticial unificando as terminologias e reformulando as classificações propostas, publicando no ano de 2000. A epidemiologia da fibrose pulmonar idiopática ainda é pouco conhecida, estima-se, nos EUA, uma prevalência entre 14 e 43 casos/100.000 e uma incidência anual entre 7 e 16 casos/100.000 habitantes. No nosso meio faltam dados confiáveis sobre a epidemiologia desta moléstia, além disso, geralmente está associada a baixa sobrevida (1).

1.2 Definição do Interstício

O espaço exíguo entre células endoteliais, o epitélio alveolar, incluindo os tecidos conjuntivos (fibras e células mesenquimais) e que envolvem todas as estruturas pulmonares chama-se interstício pulmonar. Abrigando brônquios, artérias, veias, vasos linfáticos e nervos, funciona como uma interface entre o meio interno e meio externo (luz alveolar), ou seja, desde o hilo até a pleura visceral.

Há três funções primordiais no interstício:

- Mecânica pulmonar (sustentação, distensibilidade);
- Defesa pulmonar (contém macrófagos e outras células inflamatórias);
- Metabólica (interação celular no meio interno pulmonar).

1.3 Doença Intersticial Pulmonar

A doença intersticial pulmonar (DIP) é um conjunto heterogêneo de doenças caracterizadas pelo desenvolvimento de infiltrados celulares e/ou deposição de matriz extracelular no parênquima e espaços aéreos distais até os bronquíolos terminais (1). Estudos demonstram que as DIP apresentam altas taxas de mortalidade e que a taxa de sobrevida está estimada entre três a cinco anos, podendo alcançar 7 anos nos casos de transplante pulmonar bem sucedido e/ou programa de reabilitação pulmonar (2).

A denominação doença intersticial surgiu devido ao fato dos primeiros casos de doenças desse grupo terem sido observados apenas em fases avançadas de sua evolução, quando mostravam acentuada deposição de

colágeno no interstício pulmonar (2). As DIP abrangem uma variedade de processos patológicos, que vão desde doenças inflamatórias agudas a estágios de fibrose progressiva e irreversível (4). Fazem parte da DIP os processos inflamatórios de caráter infiltrativo, com evolução crônica ou subaguda, incluindo a toxicidade por drogas e vasculites que podem evoluir para a insuficiência respiratória grave.

A DIP pode ser classificada em dois grandes grupos:

(a) Etiologia conhecida:

- Secundárias a drogas, como os agentes antineoplásicos (bleomicina), antibióticos (nitrofurantoina), antiinflamatórios (sais de ouro e D-penicilamina), antiarrítmicos (amiodarona);
- Secundárias a inalação de agentes inorgânicos (sílica, asbesto, berílio, estanho e metais pesados), gases tóxicos (cloro, óxido de nitrogênio e dióxido de enxofre), agentes orgânicos causadores de pneumonites por hipersensibilidade (doença dos criadores de pássaros por inalação de抗ígenos de aves, pulmão do fazendeiro e pulmão dos trabalhadores com queijo) e outros tipos de agentes etiológicos (radiação, oxigênio em altas concentrações);

(b) ‘Etiologia desconhecida:

Fibrose pulmonar idiopática (FPI), sarcoidose, as doenças de preenchimento alveolar (proteinose alveolar e hemorragia alveolar difusa), as doenças císticas pulmonares (granuloma eosinofílico pulmonar e esclerose tuberosa) e outros processos, como as vasculites pulmonares, a pneumonia intersticial linfocítica e a hemossiderose pulmonar idiopática.

Umas das principais queixas dos pacientes com DIP avançada é a dispnéia, que agrava com a realização de atividades de vida diária. A presença de crepitações na auscultação pulmonar pode indicar o desenvolvimento de doença fibrótica avançada (2). Considerada como principal evento desencadeador, a lesão epitelial causa importantes doenças pulmonares, tais como a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), a fibrose cística e a fibrose pulmonar idiopática (FPI) (5).

1.4 A fibrose pulmonar idiopática (FPI)

As doenças pulmonares intersticiais incluem uma grande variedade de doenças que apresentam uma afecção comum do interstício pulmonar (distorção, ou seja, fibrose ou destruição) (6-7).

Entre as doenças intersticiais pulmonares, a fibrose pulmonar idiopática (FPI), apresenta a maior incidência e características peculiares, como a lesão progressiva do parênquima pulmonar, caracterizado por infiltrado inflamatório e fibrose variável no interstício pulmonar, resultando em prejuízo significativo da função pulmonar (6-7). Até agora, a FPI é uma doença sem tratamento efetivo disponível, ainda com cerca de 50% de mortalidade (6).

Com o objetivo de compreender melhor os mecanismos fisiopatológicos da FPI, modelos experimentais de FPI utilizando isoliocianetos, sílica, bleomicina e fluoresceína tem sido amplamente utilizados (6-8). Entretanto, a bleomicina é o modelo experimental mais utilizado com o objetivo de se investigar a fisiopatologia da FPI (6).

1.5 Patogênese da Fibrose Pulmonar Idiopática

O papel da inflamação no desencadeamento e manutenção da FPI não está devidamente esclarecido, mas na maioria das DIP, a agressão pulmonar provocada por um estímulo desconhecido produz inflamação crônica e fibrose.

Contudo, ao contrário do observado em outras DIP, a biópsia pulmonar de pacientes com FPI mostra inflamação geralmente discreta em áreas de deposição de colágeno, detectadas nos exames de imagens como alterações em “favo de mel”, bilaterais e predominantes nas áreas basais e subpleurais. Esta observação sugere que a inflamação provavelmente não é um dos principais mecanismos patogênicos da FPI (11).

Após a lesão epitelial alveolar, ocorre uma re-epitelização alveolar rápida e eficiente promovida pelos pneumócitos tipo II (PII) e por células indiferenciadas que regeneram o epitélio. Contudo, quando estimulados os pneumócitos tipo II produzem muitas citocinas e fatores de crescimento, tais como o fator de transformação do crescimento β (TGF- β), a interleucina-8 (IL-8) e a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1). De importância particular, a expressão aumentada de TGF- β em sua forma ativa induz a proliferação de fibroblastos com produção de colágeno tipo I (12-13), tendo papel central no processo de fibrose.

Múltiplos locais de lesão epitelial alveolar são substituídos por focos de proliferação fibroblástica e de diferenciação em miofibroblastos com deposição exuberante de matriz extracelular, destruição das unidades alvéolo-capilares e diminuição ou perda da função do órgão (14-11). Essas alterações têm a participação efetiva da contração dos filamentos citoplasmáticos de α -actina dos

miofibroblastos, as quais parecem ser responsáveis pela retração e deformação dos septos alveolares durante o desenvolvimento da fibrose (15).

1.6 Fibras colágenas e remodelamento

O tipo de resposta ou de reparo a ser desenvolvido após uma agressão ao epitélio alveolar depende do nível da integridade da barreira epitelial, portanto esta regeneração quanto à cicatrização depende de interações muito complexas entre células endoteliais, epiteliais alveolares, fibroblastos, macrófagos, fatores de coagulação, citocinas e fatores de crescimento. Toda perda da integridade alvéolo-capilar durante a lesão pulmonar aguda estimula a atividade pró-coagulante e a deposição excessiva de fibrina, que se não removida totalmente, favorece a deposição posterior de colágeno após a migração e acúmulo de fibroblastos (16).

Este processo cicatricial resulta na deposição de fibras colágenas principalmente (além de outras proteínas de matriz extracelular como elastinas, proteoglicanos e lamininas), que são os principais constituintes da matriz extracelular. Esta grande diversidade no tecido conjuntivo tem como principais constituintes as fibras colágenas do tipo I, II e III, que são fibrilares, e as do tipo IV, V e VI que não são fibrilares. A principal proteína estrutural do interstício pulmonar é o colágeno I, produzida em grande quantidade durante respostas fibróticas, sendo sua deposição substituta ao colágeno tipo III, provocando perda da arquitetura alveolar normal e contribuindo para a diminuição da complacência pulmonar, corroborando para a redução das trocas gasosas além das demais alterações funcionais pulmonares (17).

Numa tentativa de reparar o dano à parede alvéolo-capilar, a resposta fibroproliferativa parece ocorrer quase que imediatamente após o início da lesão. Na medida em que progride o reparo, os fibroblastos sintetizam e depositam quantidades aumentadas de matriz extracelular, a qual é intensificada pela liberação e ação de diversos fatores de crescimento e citocinas. Portanto o balanço entre a síntese e degradação não dependerá exclusivamente da quantidade de matriz celular depositada, mas também da intensidade da síntese (18).

Muitos mediadores produzidos e liberados por diferentes células promovem a proliferação e diferenciação de fibroblastos, além de estimularem a síntese de colágeno. O TGF- β é o mediador pró-fibrótico mais potente encontrado em várias doenças fibrosantes, incluindo a FPI. Diferentes classes de bloqueadores de TGF- β , incluindo inibidores de ativação como a proteína quinase do receptor de TGF- β , têm sido testados com o objetivo de desenvolver um método terapêutico para a fibrose pulmonar em humanos (19-20).

O TGF- β é secretado em sua forma inativa para o espaço extracelular e ativado por proteases extracelulares e fatores físicos tais como a radiação ionizante. O TGF- β é quimiotático para monócitos e fibroblastos, promove a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, induz a síntese de colágeno, proteoglicanos, inibe a degradação do colágeno por inibidores de proteases e provoca redução da ação das metaloproteinases de matriz (MMPs) (21-22).

Entre as isoformas existentes de TGF- β , o TGF- β 1 está envolvido na progressão da fibrose e é capaz de regular outras citocinas tais como, fator de crescimento epidérmico (FGE), fator de crescimento derivados de plaquetas

(PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1). Na fibrose pulmonar humana e também em modelos experimentais, o TGF- β é expresso por PII e em macrófagos alveolares (23-20), induz a diferenciação de miofibroblastos que aparecem após o término dos fenômenos inflamatórios iniciais (24), estimula a produção de matriz extracelular por células mesenquimais e inibe a degradação da matriz (25).

A restauração da arquitetura pulmonar normal ou o desenvolvimento de fibrose progressiva dependem do equilíbrio entre as atividades anti e pró-fibróticas (11). Existem dois principais mecanismos que estão envolvidos na degradação do colágeno extracelular, a fagocitose mediada pelos receptores e a degradação mediada por proteases e metaloproteinases (MMPs) (25). As metaloproteinases de matriz são enzimas responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular e são expressas em baixos níveis pela maioria das células mesenquimais dos tecidos adultos normais. Quando ativadas, são rapidamente bloqueados por inibidores teciduais específicos de MMPs, os TIMPs, pois o aumento da atividade de MMPs pode destruir a arquitetura de um órgão, inclusive do pulmão. As principais MMPs degradadoras de fibras colágenas são as matriz metaloproteinase-1 (MMP-1), matriz metaloproteinase-8 (MMP-8), matriz metaloproteinase-13 (MMP-13) (26) e são responsáveis pela clivagem dos colágenos I, II e III, cujos fragmentos resultantes são mais suscetíveis à digestão pelas gelatinases (MMP-2 e MMP-9), facilitando a sua remoção do tecido (22-26). A MMP-2 ou gelatinase A é distribuída no parênquima pulmonar, enquanto a MMP-9 ou gelatinase B é encontrada nos macrófagos intra-alveolares e células epiteliais alveolares (27).

As MMP-2 e MMP-9 degradam o colágeno IV, o maior constituinte da membrana basal. Elas apresentam-se aumentadas no lavado bronco-alveolar (BAL) e nas células inflamatórias do parênquima pulmonar na fase inicial da fibrose induzida por bleomicina (pico máximo no 4º dia), sugerindo um papel importante na degradação da membrana basal e facilitando a migração de células inflamatórias (28). Diferentemente da fase inicial, na fase tardia (14 a 28 dias), o PII foi a principal fonte da MMP-2, sugerindo um papel importante nessa fase, na formação de fibrose e reparo celular (28).

O apoptose também colabora com o processo de remodelamento por meio da redução do número de células do tecido de granulação intersticial e intra-alveolar (29).

1.7 Produção da substância surfactante

O epitélio alveolar é constituído por pneumócitos do tipo I (PI), os quais são responsáveis pelas trocas gasosas, pela reabsorção do fluido alveolar e, pelos pneumócitos do tipo II (PII), capazes de secretar a substância surfactante em resposta ao estiramento da parede alveolar. Ricas em microvilosidades os pneumócitos II são células cúbicas, compreendem 15% das células epiteliais alveolares e são capazes de reparar a parede alveolar (30-31). Diferentes tipos de lesões pulmonares agudas têm capacidade proliferativa como é descrita nas DIP (32). Após uma lesão o tipo de célula que reconstitui a superfície alveolar, dependerá da intensidade da destruição tecidual, portanto, quando a área lesada for pequena, ocorrerá proliferação dos PII e sua diferenciação em PI (33).

Como uma camada complexa de lipídios e proteínas, o surfactante é distribuído sobre todo espaço aéreo alveolar, reduzindo a tensão superficial e impedindo o colabamento da parede alveolar (34). As proteínas do surfactante A e D (SP-A e SP-D) são abundantes na substância lectinas do tipo C e sua síntese ocorre nos PII, nas células de clara do epitélio de revestimento bronquiolar (35-36), e possuem papel central para que o surfactante possa exercer de maneira eficiente seu papel. Assim, o surfactante contribui para a manutenção da função pulmonar, evitando o colapso das vias aéreas distais e a perda do volume residual pulmonar. Além disso, é devido à capacidade do surfactante em reduzir a tensão superficial alveolar, estabilizando os alvéolos e os bronquíolos respiratórios durante a fase expiratória, que os pulmões podem funcionar corretamente. O surfactante promove um recrutamento alveolar durante a inspiração, reduzindo o gradiente pressórico entre o interstício e o alvéolo, reduzindo e ou diminuindo assim a formação de edema alveolar.

1.8 Alterações funcionais

A redução da luz alveolar diminui a distensibilidade pulmonar e o desvio da curva pressão-volume para a direita, refletindo na redução também da complacência e o aumento do recolhimento elástico pulmonar, além da perda de unidades funcionais e/ou diminuição da expansibilidade dos alvéolos lesados, ocorrendo a redução da capacidade pulmonar total (CPT), da capacidade vital forçada (CVF) e do volume residual (VR). Ainda, os fluxos pulmonares apresentam-se aumentados, devido ao aumento da força de recolhimento elástico dos pulmões e ao aumento da luz bronquiolar por retração das áreas fibróticas.

Contudo, a relação entre o volume expiratório forçado de primeiro segundo (VEF1) e a CVF apresenta-se elevada ou normal, denominada essa alteração da função pulmonar de disfunção ventilatória tipo restritiva (41).

Observa-se também nos pacientes portadores de FPI, alterações nas trocas gasosas, devido ao distúrbio da relação ventilação/perfusão, redução da pressão parcial de oxigênio no sangue arterial (PaO₂) que é progressiva e mais acentuada no exercício (41). Ocorre também aumento da freqüência respiratória (FR) que altera a ventilação alveolar e leva à redução da pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial (PaCO₂).

Como prova funcional das repercussões descritas acima, demonstraram que os pacientes com FPI apresentam capacidade para o exercício bastante reduzida, as quais são atribuídas pela limitação da troca gasosa e pelo comprometimento ventilatório, normalmente avaliado através do teste de caminha de 6 minutos (6MWT, six minute walk test) (42). Mais especificamente, o 6MWT é utilizado para se avaliar:

- Capacidade de exercício
- Alterações funcionais resultantes da progressão da doença e/ou
- Alterações resultantes das intervenções terapêuticas

Por ser um teste acessível e validado recentemente para pacientes com FPI, a distância da caminhada correlaciona-se diretamente com o VEF1 (43).

1.9 Serotonina

Envolvida na regulação de um grande número de funções fisiológicas, com efeitos imunomoduladores através do controle de uma ampla variedade de respostas celulares, a serotonina (5-HT) é um neurotransmissor bem caracterizado, liberada nos locais de inflamação por mastócitos ativados por IgE e plaquetas; há descobertas recentes que apontam para um papel na fisiologia da asma (9).

A 5-HT induz um aumento na concentração de AMPc, sendo mediada por adenilciclase durante o processo de maturação de acordo com os níveis aumentados da 5-HTR na expressão de ARNm₄ e 5-HTR₇ subtipos durante a maturação das células dendríticas humanas (DC) (9).

Vários estudos têm demonstrado que a exposição ao alérgeno provoca, em modelos animais, bem como modelos humanos um recrutamento de IL-8 mediada por neutrófilos no pulmão, e também uma alteração dependente de IL-1β de respostas do músculo liso das vias aéreas. Portanto, pacientes com asma aguda grave, há liberação de IL-8 por DC 5-HT- ativada provocando infiltração de neutrófilos, secreção de LI-1β exacerbando alterações no músculo liso das vias aéreas (hiper-resposta) (9).

Estudo anterior mostra que o 5-HT ativa de uma forma dependente da maturação, diferentes vias de sinalização DC, enfatizando o papel imunomodulador adicional de 5-HT em locais periféricos (9).

Embora diferentes vias celulares e moleculares estejam envolvidas na fisiopatologia da fibrose pulmonar, estudos recentes demonstraram que a 5-hidroxitriptamina / serotonina (5-HT) e seus respectivos receptores (5-HTR₁ – 5-

HTR₇) estão envolvidos no desenvolvimento de fibrose pulmonar. Esses demonstram que os receptores 5-HT modulam vários aspectos biológicos de migração, proliferação e ativação celular, e são altamente expressos nos pulmões dos pacientes com FPI e também nos pulmões de animais em modelo de animal de fibrose pulmonar (9-10).

1.10 Treinamento físico aeróbio (TFA) para doenças pulmonares crônica

Evidências convincentes e crescentes apontam o papel benéfico do treinamento físico aeróbio (TFA) para o controle e gerenciamento de doenças pulmonares. Especialmente para asmáticos, estudos recentes demonstraram que pacientes asmáticos com asma persistente moderada e grave submetidos ao programa de reabilitação adequado, incluindo o treinamento físico aeróbio de intensidade baixa a moderada, melhora a função pulmonar (por exemplo, aumento da capacidade ventilatória) e sinais e sintomas relacionados à asma (por exemplo, dispnéia, broncoespasmos induzido por exercício ou variabilidade pico de fluxo expiratório) (44-45). Além disso, uma redução do consumo diário de corticosteróides inalados tem sido relatada (46-47), sugerindo um efeito antiinflamatório do TFA no pulmão asmático.

Esta hipótese dos possíveis efeitos anti-inflamatórios do treinamento físico para os pulmões dos asmáticos é reforçada pelas recentes descobertas (48), demonstrando que a TFA diminuiu os níveis de óxido nítrico exalado, e também pelos achados (45), mostram uma redução no número de eosinófilos no escarro induzido de pacientes asmáticos submetidos ao TFA.

Corroborando com essa idéia, estudos com animais demonstraram que o exercício aeróbio de intensidade baixa e moderada diminui a inflamação e o remodelamento das vias aéreas, dos vasos e do parênquima pulmonar, além de melhorar a mecânica pulmonar e a hiperresponsividade brônquica (49-50-51-52-53).

Estudos experimentais recentes também apontam os efeitos anti-inflamatórios e anti-fibróticos do TFA contra reconhecidos fatores de risco importantes para o desenvolvimento de fibrose pulmonar, como o tabagismo (54), e os poluentes atmosféricos (55) e também a infecção bacteriana / lesão pulmonar aguda (56-57).

Além disso, um estudo recente, demonstrou pela primeira vez que o TFA de natação inibiu o desenvolvimento de fibrose pulmonar em um modelo de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina (58). No entanto, no estudo citado acima, os autores não investigaram os possíveis mecanismos celulares e moleculares desses efeitos do TFA.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do TFA em esteira sobre a inflamação e sobre o remodelamento pulmonar em um modelo de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina, assim como os possíveis papéis da serotonina (5-HT) e da sinalização Akt sobre essa resposta.

1.11 Bleomicina

O modelo de fibrose pulmonar por bleomicina é caracterizado pelo aumento da inflamação (principalmente neutrófilos e macrófagos), ativação de células

epiteliais alveolares e aumento da quantidade de deposição de fibras de colágeno no parênquima pulmonar (6-8).

Para se estudar a fisiopatologia da FPI existe vários modelos que na maioria envolvem a administração de drogas, compostos químicos, irradiação ou infecção. O método mais difundido é a administração de bleomicina em roedores, a qual resulta em um processo fibrótico importante nos pulmões (37). A bleomicina é um medicamento de uso comum como coadjuvante no tratamento de diferentes tipos de câncer humano, e apresenta como um dos seus principais efeitos colaterais, a fibrose. Assim, o sulfato de bleomicina é definido como um agente quimioterápico derivado de antibióticos glicopeptídicos citotóxicos hidrossolúveis e isolado do *Streptomyces verticillus*. O sulfato de bleomicina induz a inflamação e lesão epitelial e alveolar, com aumento expressivo de radicais livres, seguido por um processo fibroproliferativo, fibrose e depleção simultânea de antioxidantes(36).

O uso do sulfato de bleomicina causa pneumonite em 46% dos pacientes submetidos a quimioterapia, sendo que dentre esses, 3% chegam ao óbito. A evolução da pneumonite pode evoluir gradualmente durante o tratamento. A diminuição dos parâmetros da função pulmonar, cianose, febre, dispnéia e tosse estão clinicamente associadas ao uso de bleomicina, resultante da sua toxicidade pulmonar (37).

Após a administração da droga é importante ressaltar que há liberação de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio, por fagócitos ativados (38). Outra característica seria o número aumentado de linfócitos encontrados no lavado bronco-alveolar, no parênquima pulmonar e no tecido linfático peribronquial de camundongos tratados com o sulfato de bleomicina e que o grau da reação

fibrótica crônica pode relacionar-se com a intensidade da resposta inflamatória aguda (2).

O padrão funcional característico da toxicidade por bleomicina é o de um distúrbio ventilatório restritivo, com considerável redução na difusão de monóxido de carbono. Pacientes sem sintomas ou alterações radiológicas, a utilização do sulfato de bleomicina determina a redução na CVF em cerca de 50% dos casos. Nos casos crônicos, pode ser observado hipoxemia com aumento do gradiente alvéolo-arterial de oxigênio (39), e nos pacientes com fibrose pulmonar idiopática compreende um bom grupo para iniciar programa de reabilitação pulmonar (40).

1.12 Reabilitação Pulmonar

Inevitavelmente todo programa de reabilitação, necessita a inclusão da avaliação do paciente, a intervenção nutricional, o suporte psico-social, a educação e o treinamento de exercício.

Com objetivos de reduzir os sintomas, estabilizar ou reverter as manifestações sistêmicas da doença, a reabilitação pulmonar é considerado um programa multidisciplinar de cuidados para o paciente com doença respiratória crônica, tradicionalmente, (DPOC) doença pulmonar obstrutiva crônica, mas os efeitos sobre outras doenças pulmonares crônicas tem sido muito pouco estudados.

Recentemente, a reabilitação pulmonar para pacientes com fibrose pulmonar tem recebido considerável atenção, pois um dos sintomas mais prevalentes na limitação da capacidade de exercício é a dispneia. Contudo, a relato de 35% dos pacientes sobre fadiga dos membros inferiores como a principal

razão interromper o teste de exercício cardiopulmonar quando realizado em cicloergômetro por redução da força do músculo quadríceps, importante observação.

Estudos sobre a reabilitação pulmonar em pacientes com FPI são escassos e a maioria dos autores utiliza o regime de treinamento adotado nos programas de reabilitação respiratória e/ou cardíaca.

Segundo Jastrzêbski (62) foi avaliado o nível de dispnéia e a qualidade de vida em pacientes com doença pulmonar intersticial (21 deles com FPI), após 6 semanas de reabilitação, neste estudo, os pacientes foram submetidos a exercícios isométricos, correcionais, de musculatura respiratória (executado em Threshold IMP, Healthdyne Technologies - UK), de tórax e treinamento em bicicleta ergométrica, todos executados durante 12 semanas.

Portanto esses autores observaram que a reabilitação causou redução da sensação de dispnéia e melhorou a qualidade de vida, sem, entretanto alterar a função pulmonar. O programa de reabilitação incluiu treinamento dos músculos respiratórios e dos membros inferiores no cicloergômetro.

No outro estudo houve resultados semelhantes observados por Holland (63). Esses autores randomizaram 57 pacientes com DPI (34 FPI) em três grupos:

- 1) Programa supervisionado de reabilitação pulmonar por 8 semanas (2x por semana);
- 2) Programa domiciliar não supervisionado (5x por semana);
- 3) Grupo controle com suporte semanal por telefone, porém sem prescrição de exercício.

O treinamento foi realizado em esteira e cicloergômetro por 30 minutos associado ao treinamento de endurance de membros superiores e de força de membros inferiores. A reabilitação melhorou a capacidade de exercício e os sintomas. Entretanto, esses benefícios não foram sustentados seis meses após a intervenção. De acordo com os dados, o treinamento físico para esse grupo de paciente é seguro e melhora a capacidade funcional, dispnéia e qualidade de vida.

A fisiologia do exercício tem realizado estudos com animais de laboratório para simular condições de estresse físico, observados em humanos com finalidade do acompanhamento das alterações sistêmicas, celulares e moleculares decorrentes da atividade física (64).

A forma crônica de realizar o exercício aeróbico é responsável por modificações no sistema cardiorrespiratório tanto em repouso, como durante o exercício, principalmente quando o treinamento aeróbico é realizado em intensidade baixa a moderada (65).

No caso de corrida em esteira para ratos e camundongos, a intensidade do esforço é elevada através do aumento da velocidade e/ou inclinação da esteira, o que possibilita a determinação da intensidade através do limiar anaeróbico em exercício incremental em esteira (66).

1.13 Justificativa

Avaliar de forma detalhada, os efeitos do treinamento físico aeróbio em um modelo de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina, de forma a permitir uma futura aplicação desses achados em humanos. Assim, busca-se conhecer os possíveis mecanismos celulares e moleculares que regulam os efeitos do treinamento físico na fibrose pulmonar, com o intuito de se obter maior credibilidade junto à comunidade científica sobre os efeitos benéficos do treinamento físico para as doenças pulmonares.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a inflamação e sobre o remodelamento pulmonar induzido pela bleomicina.

2.2 Específicos

Avaliar se os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a inflamação e o sobre o remodelamento pulmonar são acompanhados pela regulação das vias:

- a) Da serotonina nos pulmões
- b) Da Akt nos pulmões

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Animais e grupos experimentais*

Todos os animais foram obtidos a partir do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e foram mantidos em condições padrão de alimentação (ad libitum), humidade (50-75%) e luminosidade (12h claro/12h escuro) no Biotério da Universidade Nove de Julho. Setenta e dois camundongos C57Bl/6, machos, 6 a 8 semanas de idade (18 a 25g) foram distribuídos em quatro grupos: Controle (Co, n = 18), Exercício (Ex, n = 18), Fibrose (Fi, n = 18) e Fibrose Exercício + (Fi + Ex, n = 18).



Figura 1

3.2 *Modelo Experimental de Fibrose Pulmonar Induzida por Bleomicina*

Sob anestesia com ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg), o sulfato de bleomicina (1.5U/kg; Meizler Biopharma, SP, Brasil) foi administrado por via orotraqueal uma única vez no 1º dia do protocolo experimental (9).

3.3 Teste Físico e Treinamento Físico Aeróbio em Esteira

Os animais foram submetidos à adaptação na esteira ergométrica nos dias 12, 13 e 14 do protocolo experimental. A adaptação constou de 15 minutos na esteira, a uma inclinação de 25º, a uma velocidade de 0,3Km/h. No 15º dia do protocolo experimental foi realizado o teste físico inicial conforme descrito anteriormente, o qual foi repetido vinte e quatro horas antes da eutanásia dos animais. No 16º dia do protocolo experimental foi dado início ao treinamento físico na esteira ergométrica (INBRAMED, RS, Brasil), o qual foi realizado 5 vezes por semana, 60 minutos por sessão, a uma intensidade leve (50% da velocidade máxima alcançada no teste físico), durante 4 semanas (49).

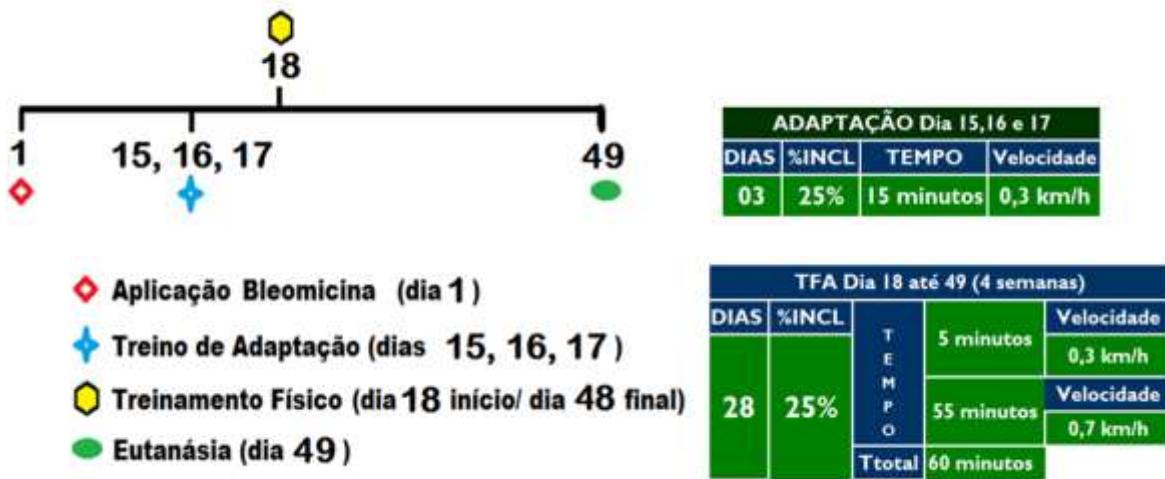


Figura 2

3.4 Avaliação da Inflamação Pulmonar

Lavado Broncoalveolar - Vinte e quatro horas após o último teste físico, os animais foram anestesiados com ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg), traqueostomizados e o lavado broncoalveolar (BAL) foi realizado utilizando-se a lavagem de 3 x 0,5ml de PBS. O número total de células foi contado utilizando um

hematocitômetro (câmara de Neubauer, Karlsruhe, Alemanha), seguida pela preparação das cytospin, as quais foram coradas com Diff-Quik e contadas 300 células seguindo os critérios morfo-hematológicos (51-56).

3.5 Avaliação de Remodelamento

Os níveis de IL-1beta, IL-6, CXCL1/KC, IL-10, TNF-alpha e TGF-beta foram quantificados no sobrenadante de BAL, utilizando kits de ELISA DouSet da R&D Systems de acordo com as recomendações do fabricante.

3.6 Avaliação dos níveis de citocinas no Lavado Broncoalveolar(LBA)

Os níveis de serotonina no LBA e no soro foram avaliados por ELISA utilizando-se o Fastrack ELISA kit de acordo com as recomendações do fabricante (DIAsource ImmunoAssays, Belgium).

3.7 Avaliação dos Níveis de Serotonina (5-HT), (5-HT2B) e para Akt Total e Fosforilada

Os pulmões direito dos 3 sets de experimento foram homogeneizados em tampão de lise RIPA Buffer (Santa Cruz, CA, EUA), deixados em banho de gelo por 30 minutos e então centrifugados a 13.300 rpm a 4°C durante 15 minutos. A quantidade de proteínas foi quantificada pelo método BCA (BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Para todas as amostras de 50 ug de proteínas foram carregados em NuPAGE 4-12% Bis-Tri-gel (Invitrogen, Carlsbad,

CA, EUA) e transferidas para membrana de nitrocelulose. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anti-5HTR-2B (diluído 1:500; sc-25647, Santa Cruz, CA, EUA), total anti-Akt (diluído 1:1000; MAB 4685; Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, EUA) e anti-Akt fosforilado (Thr308) (diluído 1:1000, MAB 2965; Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, EUA), os quais foram visualizados utilizando anticorpo secundário conjugado com horseradish-peroxidase (HRP) por quimioluminescência (Pierce; Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Uma avaliação adicional com anticorpo anti-actina para controlar a quantidade de proteínas foi realizada utilizando anticorpo monoclonal anti-actina clone C4 (Biomedicals MP, Solon, OH, EUA). A análise densitométrica da expressão das bandas foi realizada utilizando o J Image da NIH.

3.8 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa Graphpad Prism 5.0, utilizando-se ANOVA de um fator, seguido do poshoc test Newman Keuls para dados paramétricos e poshoc test Dunn's para dados não paramétricos. Os valores foram considerados significantes para $p<0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Artigo a ser submetido para o Respiratory Research

Aerobic exercise reduces lung inflammation and fibrosis mediated by serotonergic/Akt signaling in a model of pulmonary fibrosis

Paulo Rogerio Pereira¹, Yves Matos², Manoel Carneiro Oliveira-Junior¹, Ana Roberta Almeida-Oliveira¹, Flavia Regina Greiffo¹, Nicole Cristine Rigonato Oliveira¹, Adilson Santos Andrade Sousa¹, Thayse Regina Brugemann³, Humberto Delle², Regiane Albertini¹, Ana Paula Ligeiro Oliveira¹, Nilda Regina Damaceno-Rodrigues⁴, Isis Ensil Fernandez⁵, Marisa Dolnikoff⁶, Hugo Caire Castro-Faria-Neto⁷, Oliver Eickelberg⁵, Rodolfo de Paula Vieira^{1,2}

1-Laboratory of Pulmonary and Exercise Immunology (LABPEI), Nove de Julho University (UNINOVE), Rua Vergueiro 235/249, São Paulo – SP, Brazil, 01504-001.

2- Department of Medicine, Nove de Julho University (UNINOVE), Rua Vergueiro 235/249, São Paulo – SP, Brazil, 01504-001.

3- Laboratory of Experimental Therapeutics (LIM 20), School of Medicine, University of São Paulo, Av Doutor Arnaldo 455, São Paulo – SP, Brazil, 01246-903.

4- Laboratory of Cellular Biology (LIM 59), School of Medicine, University of São Paulo, Av Doutor Arnaldo 455, São Paulo – SP, Brazil, 01246-903.

5- Comprehensive Pneumology Centre (CPC), University Hospital of the Ludwig-Maximilians University Munich, Max-Lebsche-Platz 31, Munich, Germany, 81377.

6- Laboratory of Experimental Air Pollution (LIM 05), School of Medicine, University of São Paulo, Av Doutor Arnaldo 455, São Paulo – SP, Brazil, 01246-903.

7- Laboratory of Immunopharmacology, Institute Oswaldo Cruz, Oswaldo Cruz Foundation, Av Brasil 4365, Rio de Janeiro - RJ, Brasil, 21045-900.

Running head: exercise training reduces lung fibrosis.

Corresponding author:

Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira

Laboratory of Pulmonary and Exercise Immunology (LABPEI)

Nove de Julho University (UNINOVE)

Rua Vergueiro 235/249, São Paulo – SP, Brazil, 01504-001.

Phone / FAX: +55 11 3385-9001

rodrelena@yahoo.com.br

Financial support/Acknowledgements: This study was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP), grants (2012/51464-4; 2012/15165-2). MCOJ holds a PhD fellowship from FAPESP (2014/14604-8). ARAM holds a MSc fellowship from FAPESP (2014/07500-1), FRG holds a MSc fellowship from FAPESP (2014/23305-9).

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is characterized by decline of lung function, increased inflammation and fibrosis mainly in the pulmonary interstitium, with serotonin (5-HT) and Akt signaling presenting a central role. Aerobic training (AT) reduces lung injury in different models of pulmonary diseases. However, the mechanisms underlying the effects of AT in a model of bleomycin-induced lung fibrosis is unknown. Thus, this study investigated the effects of AT in a model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis, as well as the participation of 5-HT/Akt signaling. Seventy-two C57Bl/6 male mice were distributed in Control (Co), Exercise (Ex), Fibrosis (Fi) and Fibrosis+Exercise (Fi+Ex) groups. Bleomycin (1.5UI/Kg) was administered on day 1 and treadmill AT began on day 14 during 4 weeks. Total and differential cells count in bronchoalveolar lavage (BAL), neutrophils density in lung parenchyma, IL-1beta, IL-6, CXCL1/KC, IL-10, TNF-alpha and TGF-beta levels in BAL fluid, collagen content in the lung parenchyma, 5-HT levels in BAL fluid and in serum, and the expression of 5-HT2b receptor and Akt were evaluated. AT reduced bleomycin-induced number of total cells ($p<0.001$), neutrophils ($p<0.01$), macrophages ($p<0.01$) and lymphocytes ($p<0.05$) in BAL, collagen fibers deposition ($p<0.01$), IL-1beta ($p<0.01$), IL-6 ($p<0.05$), CXCL1/KC ($p<0.001$), TNF-alpha ($p<0.001$) and TGF-beta ($p<0.001$) while increased the levels of IL-10 ($p<0.001$) in BAL. AT also reduced bleomycin-increased the 5-HT levels in BAL fluid ($p<0.001$) and in serum ($p<0.05$), as well as the expression of 5-HT2b ($p<0.01$) and the phosphorylation of Akt. We conclude

that AT reduces lung inflammation and fibrosis in a model of bleomycin-induced lung fibrosis involving 5-HT/Akt signaling.

Key words: idiopathic pulmonary fibrosis, exercise immunology, physical training, serotonin, cytokines.

Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a lung disease from the group of interstitial pneumonia presenting the worst prognosis, leading to death between 3-5 years after the diagnosis (1-3). From unknown etiology, IPF patients present exercise intolerance, poor quality of life and loss of lung function and there is no effective treatment available (1-3). The lungs from IPF patients are characterized by distortion of lung architecture, alveolar epithelial cells injury, multiple foci of fibrosis (accumulation of extracellular matrix proteins) in the lung interstitium, and increased proliferation and activation of fibroblast and myofibroblast (1-3).

Serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) is a neurotransmitter and a vasoactive peptide present in very low concentrations in the circulation, which is transported mainly through platelets (4). 5-HT is involved in the control of several physiological and pathological conditions (5-8). In the context of respiratory diseases, 5-HT signaling was shown to play a role in asthma phenotype (4), in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (9) and in IPF (3).

Regular chronic physical exercise positively affects 5-HT response, mainly improving 5-HT synthesis and release resulting in antidepressant effects (10-12). These effects are also observed in experimental models of exercise also showing positive effects on experimental models of post-traumatic stress disorders (13),

and chronic unpredictable stress (14), suggesting a modulator effect of exercise on 5-HT signaling. Furthermore, exercise also inhibits lung inflammation and fibrosis in models of asthma (15-19), emphysema and COPD (20), LPS-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS) (21, 22), and in a model of lung fibrosis (23).

Therefore, the present study hypothesized that chronic aerobic exercise training could inhibit lung inflammation and fibrosis in a model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis mediated through inhibition of exacerbated 5-HT/Akt signaling.

Materials and Methods

All experimental procedures were approved by the ethical committee from School of Medicine of University of Sao Paulo (375/13) and were carried out in accordance to Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the U.S. National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, revised 1996).

Animals and experimental groups

Three sets of six mice per group were used for this study. C57Bl/6 mice (20-25 g) were obtained from the Central Animal Facility of School of Medicine of the University of Sao Paulo and distributed equally in Control (Co), Exercise (Ex), Fibrosis (Fi) and Fibrosis+Exercise (Fi+Ex) groups ($n = 18$ per group).

Protocol for Pulmonary Fibrosis Induced by Bleomycin

Sulfate of bleomycin (1.5UI/kg; Meizler Biopharma, SP, Brazil) were administered oro-tracheally under anesthesia (ketamine 100mg/kg and xylazine 10mg/kg) on day 1 of the experimental procedures.

Treadmill Exercise Test and Training

Treadmill exercise test and training was performed as previously described (16-19). Briefly, after 3 days of adaptation in the treadmill (15 minutes/day), animals were submitted to physical test, following by physical training during 4 weeks, 5x/week, 60 minutes/session, 60% of maximal velocity reached in the physical test. Twenty-four hours before the euthanasia the final physical test was performed (16-19).

Blood and Bronchoalveolar Lavage (BAL) Collection and Analysis

Under anesthesia [ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg)], one milliliter of blood was collected via vena cava, following by centrifugation at 1000g, at 4°C, during 10 minutes. Serum was collected and stored at -70°C for cytokines measurements.

Following blood collection, mice were tracheostomized and cannulated for BAL collection. The lungs were washed with 1.5 ml of PBS and 1 ml was recovered and then centrifuged at 900g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was stored at -80°C, and the cell pellet was resuspended in 1 ml of PBS. Total cell count was performed using a hematocytometer (Neubauer chamber) and the differential cell count by microscopic examination of cytopspin preparations stained with Diff Quick, and 300 cells were counted per slide (20-22).

Collagen Fibers Quantification in the Lung Parenchyma

Lungs were excised in block and submitted to histological routine. Five micrometers lung slices were stained with picrosirius red (17-20). The content of collagen fibers (red staining area) in the lung parenchyma was analyzed by image

analysis using the software Image Pro Plus 4.5 as previously described (17-20). The results were expressed as percentage of collagen fibers related to amount of lung tissue.

Serotonin (5-hidroxitriptamine; 5-HT) Measurements

The levels of 5-HT were measured in the BAL fluid and in serum using the Fastrack ELISA kit according to the manufactures' recommendations (DIAsource ImmunoAssays, Belgium).

Cytokines Measurements in BAL Fluid

The levels of IL-1beta, IL-6, CXCL1/KC, IL-10 and TNF-alpha were measured using ELISA kit according to the manufactures' recommendations (R&D Systems, MN, USA).

Western Blotting

The lungs were homogenized in RIPA lysis buffer (Santa Cruz, CA, USA) and centrifuged at 13300 rpm at 4°C for 15 minutes to remove the cell debris. The amount of proteins was quantified by BCA method (BCA Protein Assay kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). For all samples 50µg of proteins (composed by a pool of proteins of 8 animals from the same group) were loaded in NuPAGE 4-12% Bis-Tri- gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and transferred to nitrocellulose membrane. Primary antibody anti-5HTR-2B (sc-25647, Santa Cruz, CA, USA), total anti-Akt [1:1000 rabbit anti-human Akt (MAB 4685; Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA)] and phosphorylated anti-Akt (Thr308) [1:1000 rabbit anti-human phospho-Akt (MAB 2965; Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA)], were visualized using horseradish-conjugated secondary antibody and enhanced by chemiluminescence (Pierce; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). An additional probe with beta-actin for control of the amount of proteins was performed using monoclonal anti-actin antibody clone C4 (sc-130656, Santa

Cruz, CA, USA). The densitometric analysis of the expression of the bands was performed using the Image J from NIH.

Statistical Analysis

The software Sigma Stat 3.5 was used to perform the statistical analysis. The software Graph Pad Prism 5.0 was used to build the graphs. Normality analysis revealed to be parametric data and were expressed as means \pm SD. Comparisons between groups were carried out by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student-Newman-Keuls post-hoc test. Values were considered significant at $p<0.05$.

Results

Aerobic Exercise Reduces Bleomycin-induced Lung Inflammation

The Figure 1 shows the total number of cells (Figure 1A), neutrophils (Figure 1B), macrophages (Figure 1C) and lymphocytes (Figure 1D) from BAL. As demonstrated in Figure 1A, the Fi group presented increased number of total cells in BAL compared with all other groups ($p<0.001$). More specifically, the number of neutrophils (Figure 1B; $p<0.01$), macrophages (Figure 1C; $p<0.01$) and lymphocytes (Figure 1D; $p<0.05$) were significantly increased in Fi group, when compared with all other groups.

Aerobic Exercise Diminishes Bleomycin-Induced Lung Fibrosis

The Figure 2 shows the collagen fibers content in the lung parenchyma. Figure 2A shows that Fi group presented increased content of collagen fibers compared with all other groups ($p<0.001$). The Figures 2B, 2C, 2D and 2E are representative photomicrographs of slides stained for collagen fibers detection of

the groups Control (Co), Exercise (Ex), Fibrosis (Fi) and Fibrosis+Exercise (Fi+Ex), respectively.

Aerobic Exercise Inhibits Bleomycin-Induced Cytokines Release

Figure 3 shows the levels of cytokines (IL-1beta, IL-6, CXCL1/KC, IL-10, TNF-alpha and TGF-beta) in BAL fluid. Figure 3A shows that Fi group presented increased levels of IL-beta compared with all other groups ($p<0.01$). Figure 3A shows that Fi group presented increased levels of IL-1beta compared with all other groups ($p<0.01$). Figure 3B shows that Fi group presented increased levels of IL-6 compared with all other groups ($p<0.05$). Figure 3C shows that Fi group presented increased levels of CXCL1/KC compared with all other groups ($p<0.001$). Figure 3D shows that Fi group presented increased levels of TNF-alpha compared with all other groups ($p<0.001$). Figure 3E shows that Ex and Fi+Ex groups presented increased levels of IL-10 compared with all other groups ($p<0.001$). Figure 3F shows that Fi group presented increased levels of TGF-beta compared with all other groups ($p<0.001$).

Aerobic Exercise Abrogates Bleomycin-Exacerbates 5-HT Signaling

Figure 4 shows the levels of 5-HT in BAL and in serum and also the expression of 5HTR-2B in lung tissue. Figure 4A shows that Fi group presented increased levels of 5HT in serum compared with all other groups ($p<0.05$). Figure 4B shows that Fi group presented increased levels of 5-HT in BAL fluid compared with all other groups ($p<0.001$). Figure 4C shows the densitometric analysis of

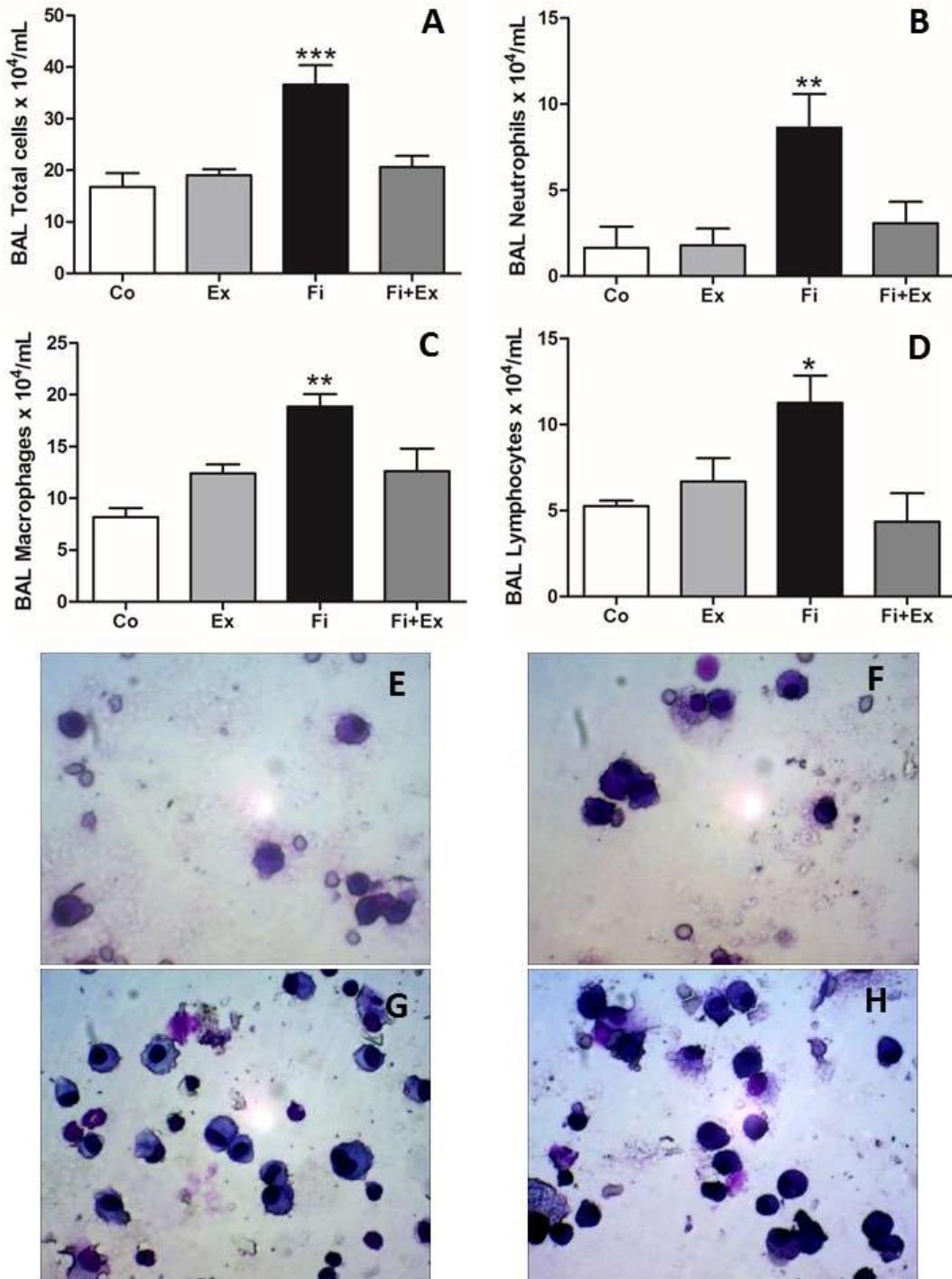
expression of 5-HTR-2B in lung tissue was increased in Fi group compared with all other groups ($p<0.001$). This figure represent an average of 3 independent experiments. Figure 4D and 4E shows the representative blotting of 5-HTR-2B and beta-actin expression of all experimental groups (Co, Ex, Fi, Fi+Ex), from left to right side.

Aerobic Exercise Blocks Bleomycin-Induced Akt Phosphorilation

Figure 5 shows the expression of total Akt and phospho-Akt in the lung tissue. Figure 5A shows the densitometric analysis of total Akt in the lung tissue. However, no differences were found comparing all groups ($p>0.05$). Figure 5B shows the densitometric analysis of phospho-Akt in the lung tissue, displaying that Fi group presented an increased expression of phosphorylated Akt compared with all other groups ($p<0.01$). These figures 5A and 5B represent an average of 3 independent experiments. Figure 5C, 5D and 5E shows the representative blotting of Akt, phospho-Akt and beta-actin expression of all experimental groups (Co, Ex, Fi, Fi+Ex), from left to right side.

Figures and Figures Legends

Figure 1 – Lung Inflammation

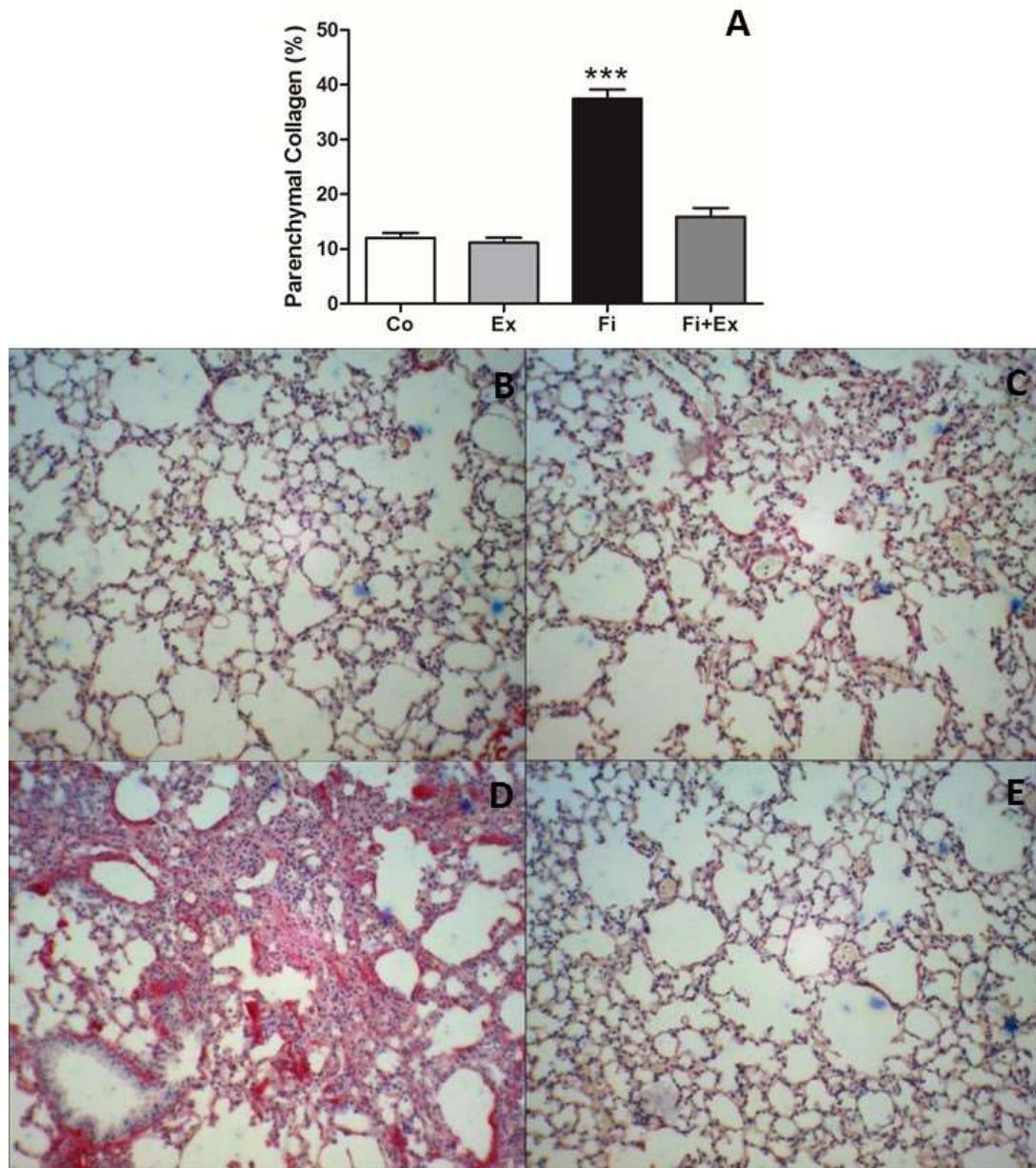


***p<0.001 when compared with all other groups. **p<0.01 when compared with all other groups.

*p<0.05 when compared with all other groups. Figures 1 E to 1 H are photomicrographs of

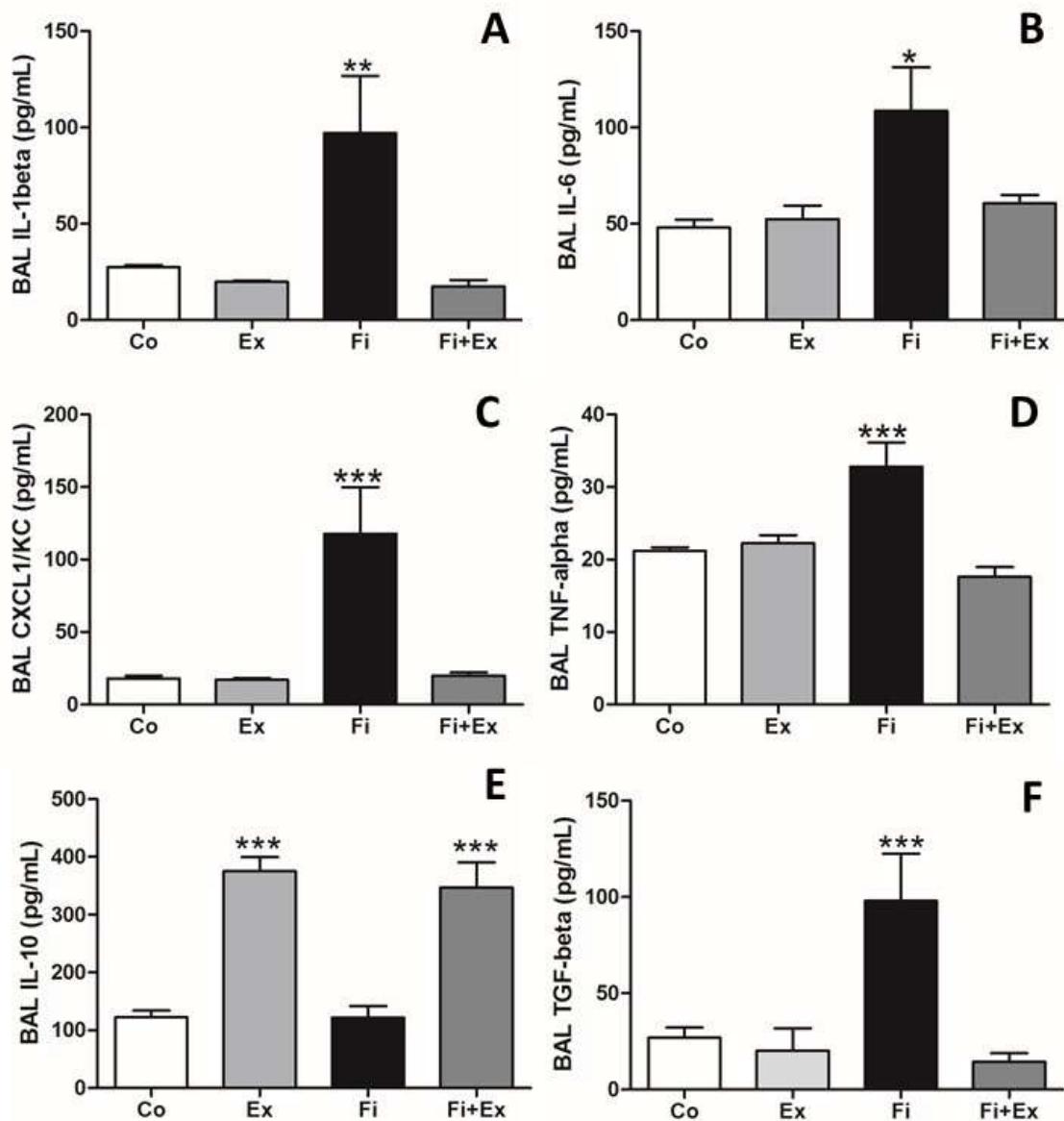
representative images from BAL from Control, Exercise, Fibrosis and Fibrosis+Exercise groups, respectively.

Figure 2 – Lung Fibrosis

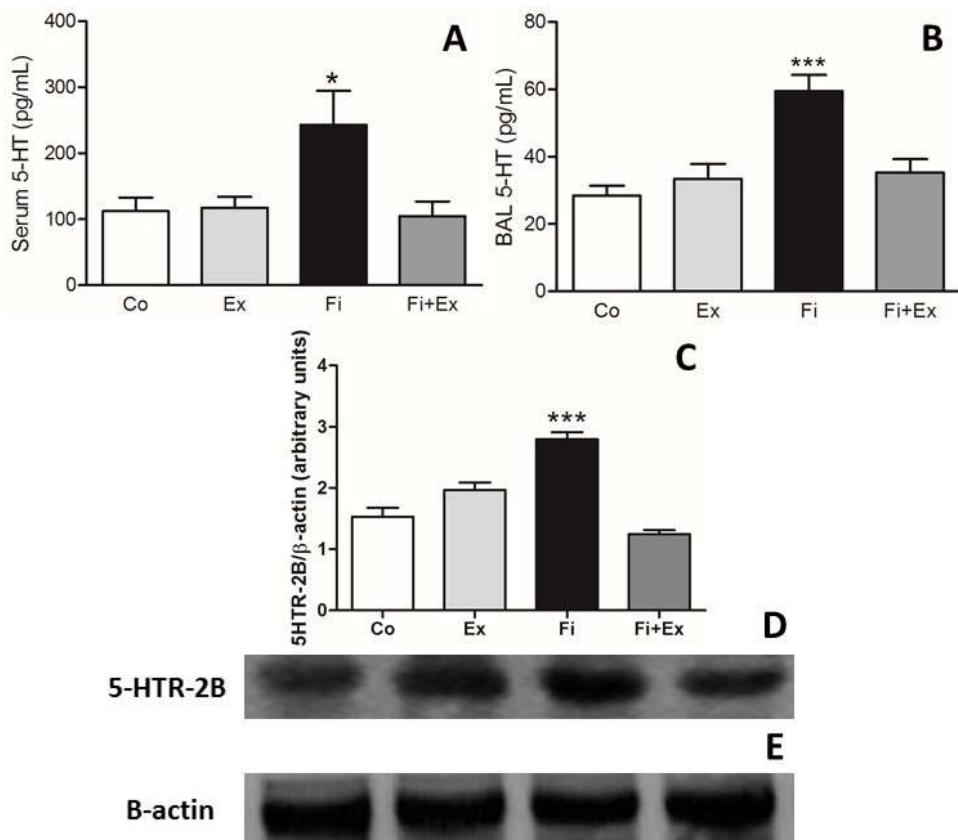


*** $p<0.001$ when compared with all other groups. Figures 2 B to 2 E are photomicrographs of representative images from lung parenchyma from Control, Exercise, Fibrosis and Fibrosis+Exercise groups, respectively.

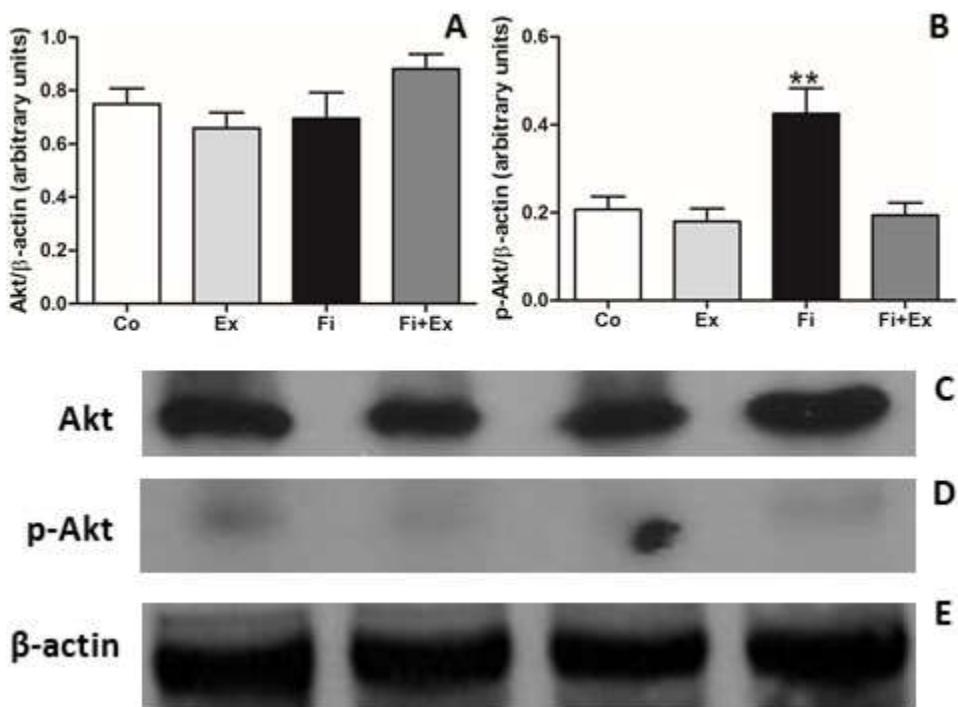
Figure 3 – Cytokines and Growth Factor Measurements



***p<0.001 when compared with all other groups. **p<0.01 when compared with all other groups. *p<0.05 when compared with all other groups.

Figure 4 – 5-HT Signaling

***p<0.001 when compared with all other groups. *p<0.05 when compared with all other groups.

Figure 5 – Akt Signaling

**p<0.01 when compared with all other groups.

Discussion

This study shows for the first time that aerobic physical training reduces lung inflammation and fibrosis mediated by 5-HT and Akt signalling in a model of bleomycin-induced lung fibrosis.

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a devastating disease with no cure or effective treatment available (1-3). The inflammatory pattern in the lungs of IPF patients are characterized by strong accumulation of leukocytes in the lung interstitium (1-3; 24). Leukocytes hyperactivation in the lungs are related with disease' severity and progression (24). In addition, experimental models using bleomycin to induce lung fibrosis have reported similarly to human findings, increased number of neutrophils, macrophages and lymphocytes in the lung

interstitium (24, 25). In agreement with the literature, the present study demonstrated increased number of neutrophils, macrophages and lymphocytes in bleomycin-treated mice. On the other hand, the results demonstrated that aerobic exercise significantly reduced the number of these cells, pointing out the anti-inflammatory effects of exercise in a model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. These findings are especially important considering the relation of pulmonary inflammation with disease' severity and progression (24).

Beyond pulmonary inflammation, IPF is mainly characterized by multiple foci of accumulation of extracellular matrix proteins (i.e. collagen, elastin, proteoglycans and laminins) in the lung interstitium and disruption of lung/alveolar architecture (1-3). These characteristics are directly related to severe decline of lung function, leading to a poor health-related quality of life (). These histopathological features are presented in models of bleomycin-induced pulmonary fibrosis (2, 3, 23-25), and were observed in the present study. So, is very important to reinforce that aerobic exercise significantly reduced the collagen fibers accumulation in this study, demonstrating the anti-fibrotic effects of exercise in a model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. These anti-fibrotic effects of aerobic exercise have been demonstrated in other models of pulmonary diseases, such as in asthma (15-19), emphysema and COPD (20), ARDS (21, 22), pulmonary fibrosis (23) and even in the lungs of mice exposed to air pollutants (26).

Cytokines and growth factors play a key role in the pathophysiology of IPF.

References

1. Fernandez IE, Eickelberg O. New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 2012; 380:680-688.
2. Fabre A, Marchal-Somme J, Marchand-Adam S, Quesnel C, Borie R, Dehoux M, Ruffie C, Callebert J, Launay JM, Henin D, Soler P, Crestani B. Modulation of bleomycin-induced lung fibrosis by serotonin receptor antagonists in mice. *Eur Respir J* 2008; 32:425-435.
3. Königshoff M, Dumitrascu R, Udalov S, Amarie OV, Reiter R, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT, Eickelberg O. Increased expression of 5-hydroxytryptamine2A/B receptors in idiopathic pulmonary fibrosis: a rationale for therapeutic intervention. *Thorax* 2010; 65:949-955.
4. Dürk T, Duerschmied D, Müller T, Grimm M, Reuter S, Vieira RP, Ayata K, Cicko S, Sorichter S, Walther DJ, Virchow JC, Taube C, Idzko M. Production of serotonin by tryptophan hydroxylase 1 and release via platelets contribute to allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187:476-485.
5. Postal M, Appenzeller S. The importance of cytokines and autoantibodies in depression. *Autoimmun Rev*. 2014 Sep 18. pii: S1568-9972(14)00196-7.
6. Watts SW. Serotonin and sensory nerves: Meeting in the cardiovascular system. *Vascul Pharmacol*. 2014 Oct;63(1):1-3.
7. Monti JM, Jantos H. The role of serotonin 5-HT7 receptor in regulating sleep and wakefulness. *Rev Neurosci*. 2014;25(3):429-37.
8. Pomytkin IA, Cline BH, Anthony DC, Steinbusch HW, Lesch KP, Strekalova T. Endotoxaemia resulting from decreased serotonin transporter (5-HTT) function: A

reciprocal risk factor for depression and insulin resistance? Behav Brain Res. 2014 May 9. pii: S0166-4328(14)00278-2.

9. Sundar IK, Yao H, Huang Y, Lyda E, Sime PJ, Sellix MT, Rahman I. Serotonin and corticosterone rhythms in mice exposed to cigarette smoke and in patients with COPD: implication for COPD-associated neuropathogenesis. PLoS One. 2014 Feb 10;9(2):e87999.

10. Melancon MO, Lorrain D, Dionne IJ. Changes in markers of brain serotonin activity in response to chronic exercise in senior men. Appl Physiol Nutr Metab. 2014 Nov;39(11):1250-6.

11. Ohmatsu S, Nakano H, Tominaga T, Terakawa Y, Murata T, Morioka S. Activation of the serotonergic system by pedaling exercise changes anterior cingulate cortex activity and improves negative emotion. Behav Brain Res. 2014 Aug 15;270:112-7.

12. Valim V, Natour J, Xiao Y, Pereira AF, Lopes BB, Pollak DF, Zandonade E, Russell IJ. Effects of physical exercise on serum levels of serotonin and its metabolite in fibromyalgia: a randomized pilot study. Rev Bras Reumatol. 2013 Nov-Dec;53(6):538-41.

13. Patki G, Li L, Allam F, Solanki N, Dao AT, Alkadhi K, Salim S. Moderate treadmill exercise rescues anxiety and depression-like behavior as well as memory impairment in a rat model of posttraumatic stress disorder. Physiol Behav. 2014 May 10;130:47-53.

14. Wen L, Jin Y, Li L, Sun S, Cheng S, Zhang S, Zhang Y, Svenningsson P. Exercise prevents raphe nucleus mitochondrial overactivity in a rat depression model. Physiol Behav. 2014 Jun 10;132:57-65.

15. Pastva A, Estell K, Schoeb TR, Atkinson TP, Schwiebert LM. Aerobic exercise attenuates airway inflammatory responses in a mouse model of atopic asthma. *J Immunol.* 2004 Apr 1;172(7):4520-6.
16. Vieira RP, Claudino RC, Duarte AC, Santos AB, Perini A, Faria Neto HC, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Nov 1;176(9):871-7.
17. Vieira RP, de Andrade VF, Duarte AC, Dos Santos AB, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Aerobic conditioning and allergic pulmonary inflammation in mice. II. Effects on lung vascular and parenchymal inflammation and remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008 Oct;295(4):L670-9.
18. Vieira RP, Toledo AC, Ferreira SC, Santos AB, Medeiros MC, Hage M, Mauad T, Martins Mde A, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Airway epithelium mediates the anti-inflammatory effects of exercise on asthma. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011 Mar 15;175(3):383-9.
19. Vieira RP, Silva RA, Oliveira-Junior MC, Greiffo FR, Ligeiro-Oliveira AP, Martins MA, Carvalho CR. Exercise deactivates leukocytes in asthma. *Int J Sports Med.* 2014 Jun;35(7):629-35.
20. Toledo AC, Magalhaes RM, Hizume DC, Vieira RP, Biselli PJ, Moriya HT, Mauad T, Lopes FD, Martins MA. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J.* 2012 Feb;39(2):254-64.
21. Ramos DS, Olivo CR, Quirino Santos Lopes FD, Toledo AC, Martins MA, Lazo Osório RA, Dolhnikoff M, Ribeiro W, Vieira RP. Low-intensity swimming training

partially inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Med Sci Sports Exerc.* 2010 Jan;42(1):113-9.

22. Reis Gonçalves CT, Reis Gonçalves CG, de Almeida FM, Lopes FD, dos Santos Durão AC, dos Santos FA, da Silva LF, Marcourakis T, Castro-Faria-Neto HC, Vieira Rde P, Dolhnikoff M. Protective effects of aerobic exercise on acute lung injury induced by LPS in mice. *Crit Care.* 2012 Oct 18;16(5):R199.
23. Prata LO, Oliveira FM, Ribeiro TM, Almeida PW, Cardoso JA, Rodrigues-Machado Mda G, Caliari MV. Exercise attenuates pulmonary injury in mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2012 Aug;237(8):873-83.
24. Paine R, Ward PA. Cell adhesion molecules and pulmonary fibrosis. *Am J Med.* 1999;268-279.
25. Mercer PF, Johns RH, Scotton CJ, Krupiczojc MA, Königshoff M, Howell DCJ, McAnullty RJ, Das A, Thorley AJ, Tetley TD, Eickelberg O, Chambers RC. Pulmonary epithelium is a prominent source of proteinase-activated receptor-1-inducible CCL2 in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179:414-425.
26. Vieira RP, Toledo AC, Silva LB, Almeida FM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Santos ABG, Rivero DH, Hizume DC, Lopes FDTQS, Olivo CR, Castro-Faria-Neto HC, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Anti-inflammatory effects of aerobic exercise in mice exposed to air pollution. *Med Sci Sports Exerc.* 2012;44(7):1227-1234.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo demonstram claramente que o treinamento físico aeróbio é capaz de reduzir a inflamação e a fibrose pulmonar em um modelo experimental de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina. Os resultados também demonstram que pelo menos em parte, esses efeitos benéficos do treinamento físico aeróbio pode ter sido mediado pelo aumento da liberação de IL-10, assim como pela redução da exacerbão dos níveis de serotonina, levando a uma redução da expressão do receptor de serotonina 5-HT2B, e também da redução da ativação da proteína Akt.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alves, R L R ou Rufino, R; Madi, K. Fibrose Pulmonar idiopática. Rio de Janeiro: Revinter, 2005. v. 01.164p.
2. Martinez, J.A.B. Interstitial lung diseases. Simpósio de doenças pulmonares, 1998 31, 247-256.
3. Costabel, U., King, T.E. International consensus statement on idiopathic pulmonary fibrosis. European Respiratory Journal, 2001 17, 163-167.
4. Guerra, M., Miranda, J.A., Leal, F., Vouga, L. Interstitial lung disease: Diagnostic accuracy and safety of surgical lung biopsy. Revista Portuguesa de Pneumologia, 2009 (3), 433-442.
5. Selman, M., Pardo, A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. Respiratory Research 2001 3(1), 1-8.
6. Fernandes IE, Eickelberg O. New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. Lancet 2012; 380: 680–88.
7. Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, Kanellopoulos J, VFJ Quesniaux, Marchand-Adam S, Crestani B, Ryffel B, Couillin I. Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2010; 182: 774–783.
8. Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2008; 294: L152–60.
9. Idzko M, Panther E, Stratz C. The serotonergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. J Immunol 2004;172:6011e19.
10. Königshoff M, Dumitrascu R, Udalov S, Amarie OV, Reiter R, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT, Eickelberg O. Increased expression of 5-hydroxytryptamine2A/B receptors in idiopathic pulmonary fibrosis: a rationale for therapeutic intervention. Thorax. 2010 Nov;65(11):949-55.
11. Geiser, T. Idiopathic pulmonary fibrosis – a disorder of alveolar wound repair? Swiss Medical Weekly, 2003 133, 405-411.

12. Chapman, H.A. Disorders of lung matrix remodeling. *The Journal of Clinical Investigation*, 2004 113, 148-157.
13. Gharaee-Kermani, M., Gyetko, M.R., HU, B., Phan,S.H. New Insights into the Pathogenesis and Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Potential Role for Stem Cells in the Lung Parenchyma and Implications for Therapy. *Pharmaceutical Research*, 2007 24(5), 819-841.
14. Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T.M., Xue, C., Okada, H., Neilson, E.G. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 2002 110, 341-350.
15. Desmouliere, A., Redard, M., Darby, I., Gabbiani, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *American Journal of Pathology*, 1995 146, 56-66.
16. Goldstein, R.H. Control of type I collagen formation in the lung. *Am J Physiol*, 1991 5: L29-40.
17. Entzian, P., Huckstadt, A., Kreipe, H., Barth, J. Determination of serum concentrations of type III procollagen peptide in mechanically ventilated patients. *Am Rev Respir Dis* 1990 142, 1079-82.
18. Souza, A.B., Santos, F.B., Negri, E.M., ZIN, W.A., Rocco, P.R.M. Lung tissue remodeling in the acute respiratory distress syndrome. *Jornal de Pneumologia* 2003 29(4), 235-245.
19. Bartram, U., Speer, C.P. The role of transforming growth factor β in lung development and disease. *Journal American College of Chest Physicians*, 2004 125, 754-765.
20. Laurent, G.J., Mcanulty, R.J., Hill, M., Chambers, R. Escape from the Matrix Multiple Mechanisms for Fibroblast Activation in Pulmonary Fibrosis. *American Thoracic Society*, 2008 5, 311-315.
21. Toews, G.B. Cytokines and the lung. *European Respiratory Journal* 2001 18(34), 3s-17s.
22. Pardo, A., Selman, M. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *American Thoracic Society*, 2006 3, 383-388.
23. Broekelmann, T.J., Limper, A.H., Colbyt, T.V., McDonald, J.A. Transforming growth factor β 1 is present at sites of extracellular matrix gene

expression in human pulmonary fibrosis. National Academy of Sciences of the United States of American, 1991 88, 6642-6646.

24. Masseno, A.P.B., Porto, C.D., Nunes, L.C., Sequeira, J.L., Alvarenga, M.A. Miofibroblastos: Revisão de Literatura. Veterinária e Zootecnia 2010 17(2), 177-190.

25. Kjel, A., MatinN, G.E.M., Kolb, M., Guldie, J. Targeting genes for treatment in idiopathic pulmonary fibrosis. American Thoracic Society, 2006 3: 389- 393.

26. Corbel, M., Boichot, E., Lagente, V. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2000 33, 749-754.

27. Miserocchi, G., Negrini, D., Passi, A., De Luca, G. Development of lung edema: interstitial fluid dynamics and molecular structure. News Physiol. Sci. 2001 16, 66-71.

28. Kim, J. Y., Choeng, H. C., AHN, C., CHO, S. H. Early and late changes of MMP-2 and MMP-9 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Yonsei Med J 2009 50(1), 68-77.

29. Toews, G.B. Cellular alterations in fibroproliferative lung disease. Chest 1999 116(1), 112s-116s.

30. Sugahara, K., Tokumine, J., Teruya, K., Oshiro, T. Alveolar epithelial cells: differentiation and lung injury. Respirology 2006 11, 28s-31s.

31. Serrano-Mollar, A., Nacher, M., Gay-Jordi, G., Closa, D., Xaubet, A., Bulbena, O. Intratracheal transplantation of alveolar type II cells reverses bleomycin-induced lung fibrosis. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2007 176, 1261-1268.

32. McElroy, M.C., Kasper, M. The use of alveolar epithelial type I cell-selective markers to investigate lung injury and repair. European Respiratory Journal 2004 24: 664-673.

33. Zhang, F., Nielsen, L.D., Lucas, J.J., Mason, R.J. Transforming growth factor- β antagonizes alveolar type II cell proliferation induced by keratinocyte growth factor. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2004 31, 679-686.

34. Rebello, C.M., Proen  a, R.S.M., Troster, E.J., Jobe, A.H. Exogenous surfactant therapy – what is established and what still needs to be determined. *Jornal de Pediatria*, 2002 78(2), s215-s226.
35. Kuroki, Y., Akino, T. Pulmonary surfactant protein-A (SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991 266(5),3064- 3073.
36. Le Vine, A.M., Kurak, K.E., Wighton, J.R., Watford, W.T., Bruno, M.D., Ross G.F., Whitsett, J.A., Korfhagen, T.R. Surfactant protein-A binds group B streptococcus enhancing phagocytosis and clearance from lungs of surfactant protein-A deficient mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1999 20, 279-286.
37. Moeller, A., Ask K., Warburton, D., Gauldie, J., Kolb, M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol*, 2008 40(3), 362-382.
38. Gao F., Kinnula, V. L., Myllarniemi, M., Oury, T. D. Extracellular Superoxide Dismutase in Pulmonary. *Antioxidants & redox Signaling*, 2008 10(2), 343– 354.
39. Rubin, A.S., Moreira, J.S., Porto, N.S., Irion, K.L., Moreira, R.F., Scheidt, B. Pulmonary idiopathic fibrosis: clinical findings and survival in 132 histologically-proven patients. *Jornal de Pneumologia*, 2000 26(2), 61-68.
40. Spruit, M. A., Janssen, D. J. A., Franssen, F. M. E., Wouters, E. F. M. Rehabilitation and palliative care in lung fibrosis. *Respirology* 2009 14, 781–787.
41. Thomeer, M., Grutters, J.C., Wuyts, W.A., Wilems, S., Demedts, M.G. Clinical use of biomarkers of survival in pulmonary fibrosis. *Respir Res* 2010 11(89).
42. Cahalin, L. P., Mathier, M. A., Semigran, M. J., DEC, G. W., Disalvo, T. G. The six-minute walk test predicts peak oxygen uptake and survival in patients with advanced heart failure. *Chest*, 1996 110, 325-332.
43. Mura M., Ferrettil, A., Ferro, O., Zompatori, M., Cavalli, A., Schiavina, M., Fabbri, M. Functional predictors of exertional dyspnea, 6-min walking distance and HRCT fibrosis score in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration*, 2006 73(4), 495-502.

44. Ram FS, Robinson SM, Black PN, Picot J. Physical training for asthma. Cochrane Database Syst Rev 2005 (4):CD001116.
45. Mendes FA, Almeida FM, Cukier A, Stelmach R, Jacob-Filho W, Martins MA, Carvalho CR. Effects of aerobic training on airway inflammation in asthmatic patients. Med Sci Sports Exerc. 2011 Feb;43(2):197-203.
46. Neder JA, Nery LE, Silva AC, Cabral ALB, Fernandes ALG. Short term effects of aerobic training in the clinical management of moderate to severe asthma in children. Thorax 1999 54:202-6.
47. Fanelli A, Cabral ALB, Neder JA, Martins MA, Carvalho CRF. Exercise training on disease control and quality of life in asthmatics children. Med Sci Sports Exerc 2007 39:1481-86.
48. Gonçalves RC, Nunes MPT, Cukier A, Stelmach R, Martins MA, Carvalho CRF. Effects of an aerobic physical training program on psychosocial characteristics, quality-of-life, symptoms and exhaled nitric oxide in individuals with moderate or severe persistent asthma. Rev Bras Fisioter 2008 12:127-135.
49. Hewitt M, Estell K, Davis IC, Schwiebert LM. Repeated bouts of moderate intensity aerobic exercise reduce airway reactivity in a murine asthma model. Am J Respir Cell Mol Biol 2010 42:243-9.
50. Vieira RP, Claudino RC, Duarte ACS, Santos ABG, Perini A, Faria Neto HCC, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CRF. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. Am J Resp Crit Care Med 2007 176:871-77.
51. Vieira RP, Andrade VF, Duarte ACS, Santos ABG, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CRF. Aerobic conditioning and allergic pulmonary inflammation in mice II: effects on lung vascular and parenchymal inflammation and remodeling. Am J Physiol Lung Cel Mol Physiol 2008 295:L670-79.
52. Silva RA, Vieira RP, Duarte AC, Lopes FD, Perini A, Mauad T, Martins MA, Carvalho CR. Aerobic training reverses airway inflammation and remodelling in asthma murine model. Eur Respir J Nov 2010 35: 994-1002.
53. Silva ACD, Vieira RP, Nisiyama M, Santos ABG, Perini A, Mauad T, Dolhnikoff M, Martins MA, Carvalho CRF. Exercise inhibits allergic lung inflammation. Int J Sports Med. 2012 33(5):402-409. (Impact factor 2.433).

54. Toledo AC, Magalhaes RM, Hizume DC, Vieira RP, Biselli PJC, Moriya HT, Mauad T, Lopes FDTQS, Martins MA. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J.* 2012; 39(2):254-264.
55. Vieira RP, Toledo AC, Silva LB, Almeida FM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Santos AB, Rivero DH, Hizume DC, Lopes FDTQS, Olivo CR, Castro-Faria-Neto HC, Martins MA, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. Anti-inflammatory effects of aerobic exercise in mice exposed to air pollution. *Med Sci Sport Exe.* 2012; 44(7):1227-1243.
56. Ramos DS, Olivo CR, Lopes FDTQS, Toledo AC, Martins MA, Osório RAL, Dolhnikoff M, Ribeiro W, Vieira RP. Low-intensity swimming training partially inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Med Sci Sports Exer* 2010; 42(1):113-119.
57. Gonçalves CTR, Gonçalves CGR, Almeida FM, Lopes FDTQS, Silva LFF, Marcourakis T, Castro-Faria-Neto HC, Vieira RP, Dolhnikoff M. Protective effects of aerobic exercise on acute lung injury induced by LPS in mice. *Critical Care* 2012; 16:199.
58. Prata LO, Oliveira FM, Ribeiro TM, Almeida PW, Cardoso JA, Rodrigues-Machado Mda G, Caliari MV. Exercise attenuates pulmonary injury in mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp Biol Med* 2012; 237(8):873-883.
59. Vieira RP, Müller T, Grimm M, Gernler V, Vetter B, Dürk T, Cicko S, Ayata K, Sorichter S, Royabe B, Zeiser R, Ferrari D, Boeynaems JM, Virchow C, Idzko M. The purinergic receptor P2Y6 contributes to airway inflammation and remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184(2):215-223.
60. Vieira RP, Toledo AC, Ferreira SC, Santos ABG, Medeiros MC, Hage M, Mauad T, Dolhnikoff M, Martins MA, Carvalho CRF. Airway epithelium mediates the anti-inflammatory effects of exercise on asthma. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011; 175(3):383-389.
61. Olivo CR, Vieira RP, Arantes-Costa FM, Perini A, Martins MA, Carvalho CRF. Effects of aerobic exercise on chronic allergic airway inflammation and remodeling in guinea pigs. *Resp Physiol Neurobiol*. 2012; 182(2-3): 81-87.

62. Jastrzebski, D, Gumola, A , Gawlik, R, Kozielski, J. Dyspnea and Quality of Life in Patients With Pulmonary Fibrosis After Six Weeks of Respiratory Rehabilitation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 57(4), 139-148, 2006.
63. Holland, A E, Hill, C J, Conron, M, Munro, P, McDonald, C F. Short term improvement in exercise capacity and symptoms following exercise training in interstitial lung disease. *Thorax*, v. 63, 549–554, 2008.
64. Papoti, M, Almeida, PBL, Prada, FJA, Eleno, TG, Hermini, HA, Gobatto, CA, Mello, MAR. Maximal lactate steady-state during swimming in rats recovered from protein malnutrition. *Motriz*, v. 9(2), 103 – 110, 2003.
65. Medeiros, SA, Gianolia, RM, Kalil, LMP, Rosa, LFBC, Negrão, CE, Brum, PC. Efeito do treinamento físico com natação sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos. *Rev. Paul. Educ. Fís.*, v. 14(1), 7-15, 2000.
66. Gobatto, CA, Mello, CYS, Azevedo, JRM, Santos, LA, Kokubun, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.130, 21-27, 2001.

7 ANEXO I

Carta de aprovação no Comitê de Ética da Universidade de São Paulo.



A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 20/02/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **375/13** intitulado: “**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NA FIBROSE PULMONAR**” que utilizará **320** animais da espécie **BALB/c e C57Bl/6**, apresentado pelo **Departamento de PATOLOGIA**

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

Pesquisador (a) Responsável: Marisa Dolhnikoff

Pesquisador (a) Executante: Rodolfo de Paula Vieira

CEP-FMUSP, 20 de Fevereiro de 2014.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammam
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa