

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

**MAYSA ALVES RODRIGUES BRANDÃO RANGEL**

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NA RESPOSTA PULMONAR EM**  
**MODELO EXPERIMENTAL DE DPOC: ENVOLVIMENTO DA STAT3**

**São Paulo, SP**

**2016**

**MAYSA ALVES RODRIGUES BRANDÃO RANGEL**

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NA RESPOSTA PULMONAR EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE DPOC: ENVOLVIMENTO DA STAT3**

Dissertação apresentada à  
Universidade Nove de Julho  
para obtenção do título de  
Mestre em Medicina

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo de  
Paula Vieira

**São Paulo, SP**

**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

***Rangel, Maysa Alves Rodrigues Brandão.***

***Efeitos do treinamento físico aeróbio na resposta pulmonar em modelo experimental de DPCO: envolvimento da stat3. / Maysa Alves Rodrigues Brandão Rangel. 2016.***

***83 f.***

***Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2016.***

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

***1. DPOC. 2. Exercício 3. Inflamação. 4 Treinamento aeróbio. 5. STAT.***

***I. Vieira, Rodolfo de Paula.***

***II. Título.***

***CDU 616***

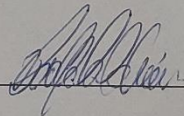
São Paulo, 16 de dezembro de 2016.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: **Maysa Alves Rodrigues Brandão Rangel**

Título da Dissertação: **“Efeitos do treinamento físico aeróbico na resposta pulmonar em modelo experimental de DPOC: Envolvimento da STAT3 .”**

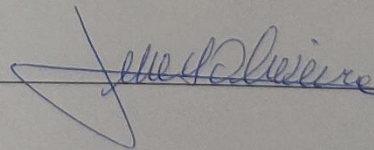
Presidente: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira



Membro: Profa. Dra. Beatriz Manguiera Saraiva Romanholo



Membro: Prof. Dr. Luis Vicente Franco de Oliveira



## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu esposo Marcelo, meus filhos Alice e Daniel, aos meus pais, meu irmão e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Mãe, seu cuidado e dedicação foi que deram, em alguns momentos, a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

Aos amigos e colegas, do Hospital Municipal José de Carvalho Florence e AME pelo incentivo e pelo apoio constantes, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção melhoraram tudo o que tenho produzido na vida.

Á um mestre, Dr Alejandro Barbas que sempre me incentivou na caminhada e no conhecimento científico.

Aos meus amigos, Alex e Cintia que sempre tiveram próximos de mim, me incentivando e apoiando nas minhas decisões.

A minha companheira de orações Rosa Helena, sem ela meu fardo seria mais pesado, porém suas orações fizeram tudo mais leve.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que se mostrou criador, que foi criativo. Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

Ao meu professor e orientador Dr Rodolfo de Paula Vieira, pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta tese. Eu posso dizer que a minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem a sua pessoa.

À professora Dra Ana Paula Ligeiro, por seus ensinamentos e confiança ao longo das minhas atividades. É um prazer tê-la na banca examinadora, bem como aos colegas do Laboratório de Imunologia Pulmonar e do Exercício (LABPEI), por todo o companheirismo. Gostaria de agradecer especialmente ao colega Manoel Carneiro de Oliveira Júnior, por todos os ensinamentos neste período e ao colega Adriano Rennó pela paciência em me ouvir sempre.

À Universidade Nove de Julho que me acolheu e me proporcionou crescimento acadêmico e profissional.

Agradeço também ao meu esposo, Marcelo, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades.

## RESUMO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma enfermidade respiratória prevenível e tratável, caracterizada pela presença de obstrução crônica do fluxo aéreo, a qual não é totalmente reversível. A obstrução do fluxo aéreo é geralmente progressiva e está associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões, causada principalmente pelo tabagismo. As citocinas têm um papel central nessa resposta inflamatória, e são coordenadas por diversas vias celulares e moleculares, dentre elas, a via *Janus quinase* (JAK) e a *signal transdutor and activator of transcription* (STAT). O treinamento físico aeróbio (TFA) realizado de maneira adequada apresenta efeitos anti-inflamatórios para as vias aéreas em modelos experimentais de DPOC. No entanto, até o momento nenhum trabalho avaliou alguma possível via celular e molecular envolvida nos efeitos do TFA na DPOC. Portanto, o presente estudo, avaliou os efeitos do TFA de intensidade leve em esteira ergométrica (5x/semana, 30 dias, 1h/sessão), em um modelo experimental de DPOC, em camundongos machos C57Bl/6. O modelo de DPOC utilizou a exposição à fumaça de cigarro, 2 vezes ao dia, durante 90 dias. Após a exposição inicial por 60 dias à fumaça de cigarro, o grupo experimental DPOC+TFA iniciou o TFA por 30 dias. Dessa forma, os grupos experimentais foram: Controle (n = 20), TFA (n = 20), DPOC (n = 20) e DPOC+TFA (n = 20). O modelo experimental foi capaz de induzir o enfisema pulmonar, avaliado através do Lm (diâmetro alveolar médio) ( $p < 0.001$ ) comparado ao grupo Controle, alteração completamente inibida pelo TFA ( $p < 0.001$ ). Além do enfisema, o modelo experimental também induziu um quadro de bronquite crônica, evidenciado através do acúmulo de células totais ( $p < 0.001$ ), de neutrófilos ( $p < 0.001$ ), de linfócitos ( $p < 0.001$ ) e de macrófagos ( $p < 0.001$ ) no lavado broncoalveolar (LBA), quando comparado ao grupo Controle. Por outro lado, o TFA foi capaz de inibir esse

quadro inflamatório, diminuindo o acúmulo de células totais ( $p < 0.001$ ), de neutrófilos ( $p < 0.001$ ), de linfócitos ( $p < 0.001$ ) e de macrófagos ( $p < 0.001$ ) no LBA. De maneira complementar, a inflamação pulmonar também foi avaliada através da técnica histomorfométrica, onde o número de neutrófilos, linfócitos e macrófagos na parede das vias aéreas foram contados. O modelo experimental de DPOC também induziu um acúmulo de neutrófilos ( $p < 0.001$ ), de linfócitos ( $p < 0.001$ ) e de macrófagos ( $p < 0.001$ ) na parede das vias aéreas, os quais foram completamente inibidos pelo TFA, tanto para os neutrófilos ( $p < 0.001$ ), linfócitos ( $p < 0.001$ ) e macrófagos ( $p < 0.001$ ). O modelo de DPOC também induziu o acúmulo de fibras de colágeno ( $p < 0.001$ ) nas vias aéreas, o qual foi reduzido pelo TFA ( $p < 0.001$ ). O modelo experimental de DPOC também induziu um aumento dos níveis de IL-1beta ( $p < 0.001$ ), IL-6 ( $p < 0.001$ ), CXCL-1 ( $p < 0.001$ ) e TNF-alfa ( $p < 0.001$ ), comparado ao grupo Controle, os quais foram reduzidos pelo TFA, IL-1beta ( $p < 0.001$ ), IL-6 ( $p < 0.001$ ), CXCL-1 ( $p < 0.001$ ) e TNF-alfa ( $p < 0.001$ ), comparado ao grupo DPOC. O modelo de DPOC também aumentou a expressão de STAT3 fosforilada, pelos leucócitos peribrônquicos ( $p < 0.001$ ), pelos leucócitos no parênquima ( $p < 0.001$ ) e pelo epitélio brônquico ( $p < 0.001$ ) comparado ao grupo Controle, as quais foram reduzidas pelo TFA nos leucócitos peribrônquicos ( $p < 0.001$ ), pelos leucócitos no parênquima ( $p < 0.001$ ) e pelo epitélio brônquico ( $p < 0.001$ ) comparado ao grupo Controle. Assim, concluímos que o TFA de intensidade leve é capaz de reverter as principais características da DPOC em modelo experimental, as quais parecem ter a participação da STAT3.

**Palavras-chave:** DPOC, exercício, inflamação, treinamento aeróbio, STAT.



## ABSTRACT

The chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a preventable and treatable pulmonary disease, characterized by the presence of chronic air flux obstruction, which is not totally reversible. The air flux obstruction is commonly progressive and is associated to an abnormal inflammatory lung's response, caused mainly by smoking. The cytokines play the main role in this inflammatory response, and are coordinated by lots of cellular and molecular pathways, including the *Janus quinase* (JAK) and the *signal transducer and activator of transcription* (STAT) paths. The aerobic physical training (APT), taken correctly, provides anti-inflammatory effects to the airways experimental models of COPD. However, no research has analyzed any possible cellular and molecular pathways related to APT effects on COPD until the present moment. This present study analyzed the APT's effects of light intensity on an ergometric treadmill (5x/a week, 30 days, 1h/a session), in an experimental COPD model, in C57Bl/6 male mice. The COPD model used cigarettes' smoke exposition 2 times a day, for 90 days. After the 60 first days of exposition to cigarettes' smoke, the COPD + APT experimental group started the APT for 30 days. In this way, the experimental groups were: Control (n = 20), APT (n = 20), COPD (n = 20) and COPD + APT (n = 20). The experimental model could induce pulmonary emphysema, which was analyzed through the comparison of the alveolar medium diameter ( $p < 0.001$ ) with the Control group, which alteration was completely inhibited by APT ( $p < 0.001$ ). Beyond the emphysema, the experimental model also induced chronic bronchitis, observed through the gathering of total cells ( $p < 0.001$ ), of neutrophils ( $p < 0.001$ ), of lymphocytes ( $p < 0.001$ ) and of macrophages ( $p < 0.001$ ) in the bronchoalveolar lavage fluid (BAL), when compared with the Control group. On the other hand, the APT could inhibit the inflammatory process, diminishing the gathering of total cells ( $p < 0.001$ ), of neutrophils

( $p < 0.001$ ), of lymphocytes ( $p < 0.001$ ) and of macrophages ( $p < 0.001$ ) in the BAL. As a complementary analysis, the pulmonary inflammation was also studied through the histomorphometric technique, where the number of neutrophils, of lymphocytes and of macrophages in the airways' wall were counted. The COPD experimental model also induced the gathering of neutrophils ( $p < 0.001$ ), of lymphocytes ( $p < 0.001$ ) and of macrophages ( $p < 0.001$ ) in the airways wall, which were all completely inhibited by the APT, including neutrophils ( $p < 0.001$ ), lymphocytes ( $p < 0.001$ ) and macrophages ( $p < 0.001$ ). The COPD model also induced the gathering of collagen fibers ( $p < 0.001$ ) in the airways, which was reduced by the APT ( $p < 0.001$ ). The COPD experimental model also induced increasing levels of IL-1beta ( $p < 0.001$ ), IL-6 ( $p < 0.001$ ), CXCL-1 ( $p < 0.001$ ) and TNF-alfa ( $p < 0.001$ ), compared with the Control group, which were all reduced by APT, including IL-1beta ( $p < 0.001$ ), IL-6 ( $p < 0.001$ ), CXCL-1 ( $p < 0.001$ ) and TNF-alfa ( $p < 0.001$ ), when compared with the COPD group. The COPD model also increased phosphorylated STAT3 expression by peribronchial leukocytes ( $p < 0.001$ ), by leukocytes in the parenchyma ( $p < 0.001$ ) and by bronchial epithelium ( $p < 0.001$ ), compared with the Control group. STAT3 levels were reduced by APT in peribronchial leukocytes ( $p < 0.001$ ), in leukocytes in the parenchyma ( $p < 0.001$ ) and in bronchial epithelium ( $p < 0.001$ ), compared with the Control group. In this way, we concluded that APT of light intensity can reverse the main characteristics of COPD in experimental models and those characteristics apparently are related to STAT3.

**Keywords:** COPD, exercise, inflammation, aerobic training, STAT.

## SUMÁRIO

<b>1.Contextualização</b> .....	01
<b>1.1-Conceito</b> .....	01
<b>1.2-Fisiopatologia</b> .....	02
<b>1.3-Imunopatologia</b> .....	05
<b>1.4-Inflamação</b> .....	09
<b>1.5-Via de Sinalização da JAK/STAT</b> .....	17
<b>2. Objetivos</b> .....	20
<b>2.1- Geral</b> .....	20
<b>2.2- Específicos</b> .....	20
<b>3. Método</b> .....	21
<b>3.1- Delineamento do estudo</b> .....	21
<b>3.2- Modelo experimental</b> .....	21
<b>3.3- Protocolo</b> .....	22
<b>3.3.1- Modelo de treinamento físico aeróbio como intervenção terapêutica</b> .....	22
<b>3.4- Avaliações</b> .....	22
<b>3.4.1--Coleta de Sangue</b> .....	22
<b>3.4.2- Avaliação da inflamação pulmonar no Lavado Bronco Alveolar</b> .....	22
<b>3.4.3- Avaliação dos níveis de citocinas no LBA por ELISA</b> .....	23
<b>3.4.4- Avaliação da inflamação e remodelamento</b> .....	23
<b>3.4.4- Avaliação da morte celular por citometria de fluxo</b> .....	23
<b>3.4.5- Avaliação da expressão da proteína STAT3</b> .....	23
<b>3.5- Análise estatística</b> .....	24
<b>4. Resultados</b> .....	25
<b>5.Discussão</b> .....	55

<b>6. Considerações finais.....</b>	<b>60</b>
<b>7.Referências.....</b>	<b>61</b>
<b>8.Anexos.....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Fisiopatologia da DPOC.....	06
<b>Figura 2</b> - Via de sinalização JAK-STAT.....	21
<b>Figura 3</b> Figura ilustrativa da caixa de exposição à fumaça de cigarro.....	25
<b>Figura 4</b> – Efeitos do TFA sobre o número de células totais no .....	28
<b>Figura 5</b> – Efeitos do TFA sobre o número de Neutrófilos no LBA.....	29
<b>Figura 6</b> – Efeitos do TFA sobre o número de Linfócito no LBA.....	30
<b>Figura 7</b> – Efeitos do TFA sobre o número de Macrófago no LBA.....	31
<b>Figura 8</b> – Efeitos do TFA sobre o número de L-1 Beta no LBA.....	32
<b>Figura 9</b> – Efeitos do TFA sobre o número de IL-10 no LBA.....	33
<b>Figura 10</b> -. Efeitos do TFA sobre o número de IL-17 no LBA.....	34
<b>Figura 11</b> -.. Efeitos do TFA sobre o número de TNF no LBA.....	35
<b>Figura 12</b> Efeitos do TFA sobre o número de CXCL1 no LBA -.....	36
<b>Figura 13</b> Efeitos do TFA sobre o número de Leucócitos no sangue.....	37
<b>Figura 14</b> -- Efeitos do TFA sobre o número de Neutrófilos no sangue.....	38
<b>Figura 15</b> - Efeitos do TFA sobre o número de Monócitos no sangue.....	39
<b>Figura 16</b> Efeitos do TFA sobre o número de IL-1 Beta no soro.....	40
<b>Figura 17</b> - Efeitos do TFA sobre o número de IL-10 no soro.....	41
<b>Figura 18</b> – Efeitos do TFA sobre o número de TNF ALFA no soro.....	42
<b>Figura 19</b> - Efeitos do TFA sobre o número de IL-17 no soro.....	43
<b>Figura 20</b> - Efeitos do TFA sobre o número de CXCL1 no soro.....	44
<b>Figura 21</b> - Efeitos do TFA sobre o número de colágeno na Via Aérea.....	45
<b>Figura 22</b> - Efeitos do TFA sobre o alargamento alveolar.....	46
<b>Figura 23</b> - Fotomicrografias da expressão da STAT3 nas vias aéreas.....	47

<b>Figura 24-</b> Fotomicrografias da expressão da p-STAT3 nas vias aéreas.....	48.
<b>Figura 25-</b> Efeitos do TFA sobre a expressão da STAT3 pelo epitélio brônquico....	49
<b>Figura 26-</b> Efeitos do TFA sobre a expressão da STAT3 pelos leucócitos brônquicos.....	50
<b>Figura 27-</b> Efeitos do TFA sobre a expressão da STAT3 pelos leucócitos no parênquima.....	51
<b>Figura 28-</b> Efeitos do TFA sobre a expressão da p-STAT3 pelo epitélio brônquico.	52
<b>Figura 29-</b> Efeitos do TFA sobre a expressão da p-STAT3 pelos leucócitos brônquicos.....	53
<b>Figura 30-</b> Efeitos do TFA sobre a expressão da p-STAT3 pelos leucócitos no parênquima.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>HE</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>HDM</b>	House Dust Mite
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IGF-I</b>	Insulin-like growth factor
<b>INF<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>JAK</b>	Janus kinase
<b>LBA</b>	Lavado Broncoalveolar
<b>MAPK</b>	Map kinase
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex
<b>NFK<math>\beta</math></b>	Fator Nuclear Kappa $\beta$
<b>PAS</b>	Periodic Acid-Schiff
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PSH</b>	Picrossírius
<b>RFO</b>	Resorcina Fucsina de Weigert com Oxidação
<b>ROR<math>\gamma</math>t</b>	Retinoic acid orphan receptor
<b>SOCS</b>	Supressor of cytokine signaling protein family
<b>STAT</b>	Signal ransducer and activator of transcription
<b>TCR</b>	T cell receptor
<b>TFA</b>	Treino Físico Aeróbio
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Transforming growth factor-alpha
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor-beta
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor-alpha

**VEGF** Fator de crescimento endotelial vascular

**VO<sub>2</sub>** Consumo Máximo de Oxigênio



## **1.Contextualização**

### **1.1- Conceito**

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma enfermidade respiratória que se pode tratar e prevenir, e se caracteriza pela presença de obstrução crônica do fluxo aéreo, que não é totalmente reversível, mas é progressiva, e é acompanhada de uma resposta inflamatória anormal dos pulmões (Jardim,J.R.et., al.,2004). Além disso, a DPOC também apresenta manifestações sistêmicas, ou seja, não pulmonares, que vão desde alterações metabólicas até alterações cardiovasculares (Jardim,J.R.et., al.,2004). As definições atuais de DPOC não fazem referência aos termos bronquite crônica e enfisema, embora a inflamação nas pequenas vias aéreas (bronquite e bronquiolite crônicas) e a destruição dos septos alveolares do parênquima pulmonar (enfisema) sejam as anormalidades anátomo-patológicas que determinam a obstrução ao fluxo aéreo e a diminuição das trocas gasosas características da DPOC (Jardim,J., R.,et., al.,2011).

Ainda não se tem conhecimento da real prevalência da DPOC em nosso meio, mas somente estimativas, devidos aos erros comuns de diagnóstico, seja de sub-diagnóstico ou de sobre-diagnóstico, dependendo da região (Oliveira, J.A, et., al., 2011). Os dados de prevalência para o Brasil, obtidos até o momento, são de questionário de sintomas, que permitem estimar a DPOC em adultos maiores de 40 anos em 12% da população, ou seja, 5.500.000 indivíduos (Oliveira, J.A, et., al., 2011). Se considerarmos dados preliminares do Estudo LATINO realizado pela ALAT (Associação Latino-Americana de Tórax), na cidade de São Paulo, a prevalência da DPOC varia de 6 a 15,8% da população com idade igual ou superior a 40 anos, equivalente a 2.800.000 a 6.900.000 indivíduos com DPOC (ALAT,2014). A DPOC, em 2003, foi a quinta maior causa de internamento no sistema público de saúde do

Brasil, em maiores de 40 anos, com 196.698 internações e gasto aproximado de 72 milhões de reais (ALAT,2014). Nos últimos 20 anos vem ocorrendo um aumento do número de óbitos por DPOC, em ambos os sexos, tendo a taxa de mortalidade passado de 7,88 em cada 100.000 habitantes na década de 1980, para 19,04 em cada 100.000 habitantes na década de 1990, com um crescimento de 340% (ALAT,2014). A DPOC nos últimos anos vem ocupando da 4ª à 7ª posição entre as principais causas de morte no Brasil (IBGE,2012). Portanto, o estabelecimento de estratégias não medicamentosas que possam auxiliar no tratamento e prevenção das crises do indivíduo portador de DPOC e que resulte num melhor controle da doença, são altamente necessários, para conseguir a diminuição das internações e afastamento no trabalho.

### **1.2-Fisiopatologia**

Do ponto de vista fisiopatológico, a infiltração de células inflamatórias, o dano epitelial das vias aéreas, a remodelação das vias aéreas e do parênquima pulmonar são características centrais de desordens inflamatórias do pulmão, que incluem a DPOC (Guyton, et al.,2006). Embora o pulmão consiga ter uma certa capacidade para se auto reparar de uma lesão aguda, em presença de estímulos patológicos em curso que conduzem à doença crônica, essa auto reparação não é total, resultando em fibrose, a via final comum que provoca uma perda irreversível da função pulmonar (Guyton, et al.,2006). O tabagismo é o principal fator de risco para o desenvolvimento da DPOC, além de estar relacionado a um risco aumentado de óbito devido à DPOC, ao carcinoma pulmonar e a doença coronariana isquêmica (Moreira,L.G. 2009). Este risco aumentado está diretamente relacionado à carga de tabaco. Por outro lado, somente em torno de 20% dos fumantes evolui para DPOC, sugerindo que talvez haja

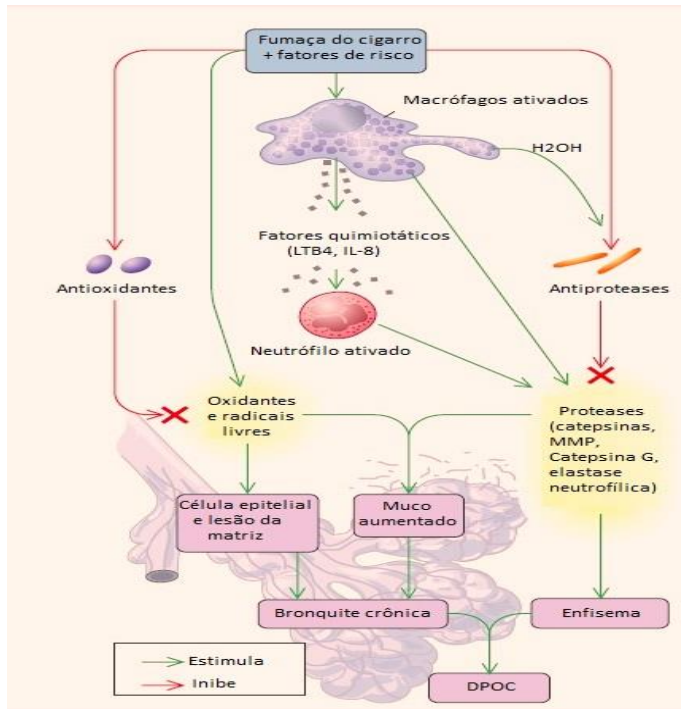
uma população de tabagistas susceptíveis ao desenvolvimento da DPOC (Moreira,L.G. 2009).

Alguns autores demonstraram a presença de linfócitos T e macrófagos na parede das vias aéreas de tabagistas, enquanto que neutrófilos são preferencialmente coletados na luz alveolar. Nesse processo inflamatório existe a participação não apenas das células inflamatórias, mas de células estruturais dos pulmões, como as células epiteliais brônquicas, músculo liso brônquico, células endoteliais e fibroblastos (Abbas, et. al.,2012). O aumento no número de macrófagos e de linfócitos, principalmente na parede das pequenas vias aéreas, tem recebido muito interesse por parte dos pesquisadores da especialidade (Vieira et al., 2011a). Diferente do que ocorre na asma, onde existe proliferação de linfócitos T com predomínio de CD4, vários achados apontam para o acúmulo de linfócitos T CD8+, especialmente (Vieira et al., 2011a). Esta dicotimização do perfil inflamatório, que é única a cada uma das doenças inflamatórias pulmonares, poderia explicar o aparecimento de mediadores inflamatórios específicos que seriam determinantes no desenvolvimento da lesão estrutural que ocorre na DPOC (Vieira et al., 2012a). Entre os mediadores que causam acúmulo de células no pulmão enfisematoso e que propiciam a manutenção do processo inflamatório, certamente existe um lugar para as quimiocinas relacionadas ao fenótipo Th1 da resposta imune (Abbas, et. al.,2012). Por exemplo, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, CCL2/MCP-1 e CCL5/RANTES têm sido aventadas como possíveis quimiocinas implicadas no recrutamento de linfócitos T e monócitos sanguíneos, facilitando o aumento de macrófagos alveolares e linfócitos T, especialmente CD8+, no parênquima dos pacientes com DPOC ((Moreira,L.G. 2009). O total conhecimento do mecanismo pelo qual ocorre o tráfego de células mononucleares em direção ao pulmão é fundamental não só para um maior

entendimento da patogênese da DPOC, mas para o desenvolvimento de terapêuticas adequadas ((Moreira,L.G. 2009). O bloqueio de receptores específicos que reduzisse o recrutamento de células inflamatórias diretamente relacionadas com a destruição pulmonar pode ser uma proposta interessante de atuação sobre esta doença.

Os macrófagos representam a maioria das células inflamatórias recolhidas das vias aéreas tanto de pessoas saudáveis quanto de pacientes com DPOC (Moreira, et., al,2009). No entanto, o número de macrófagos está aumentado entre 5 e 10 vezes no lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com DPOC, quando comparado com voluntários não tabagistas (Nascimento, E. S. P.et., al.,2015 ). O acúmulo de macrófagos nas paredes das vias aéreas e no parênquima pulmonar dos tabagistas que desenvolvem DPOC pode ser explicado tanto pelo aumento do tempo de vida da célula no pulmão como pelo aumento do recrutamento de monócitos (seu precursor) da circulação (Nascimento, E. S. P.et., al.,2015). Alguns trabalhos sugerem que a participação dos macrófagos na patogênese da DPOC tem relação com a sua capacidade de produzir enzimas denominadas de metaloproteases (MMP) como a MMP-1, MMP-9 e MMP-12 (T.C. Yeh, S. et. al.,1999). Acredita-se que as metaloproteases sejam capazes de quebrar as proteínas de forma semelhante às enzimas neutrofílicas e recrutar células inflamatórias da circulação, facilitando sua infiltração nos tecidos lesados (T.C. Yeh, S. et. al.,1999). Macrófagos recolhidos do lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com DPOC apresentam aumento da expressão de receptores para MMP-1 e MMP-9, enquanto que tanto camundongos com deficiência de MMP-12 quanto o uso de inibidores de MMP em cobaias apresentam efeito protetor à exposição à fumaça de cigarro (Nascimento, E. S. P.et., al.,2015).

Apesar de não se saber exatamente como os macrófagos atuam na DPOC, está claro que, além de quantitativamente aumentados, estas células estão relacionadas com a destruição pulmonar (Toledo, A.C.; et., al, 2012). Avaliando tecido pulmonar biopsiado de pacientes com DPOC foi verificado que as áreas mais destruídas eram circundadas por infiltrado de macrófagos e linfócitos (Toledo, A.C.; et., al, 2012). Estudos do processo inflamatório que ocorre tanto nas vias aéreas quanto na periferia pulmonar de pacientes com DPOC têm demonstrado infiltrados de linfócitos T associados aos macrófagos, fazendo com que os autores sugerissem a interação entre essas células na patogênese da DPOC (Toledo, A.C.; et., al, 2012). É importante notar que os corticosteroides são ineficazes no controle da inflamação pulmonar que ocorre na DPOC (ALAT,2014). A liberação *in vitro* de IL-8, TNF-alfa e MMP-9 de macrófagos de pessoas não tabagistas ou de tabagistas sem obstrução brônquica pode ser inibida pelo uso de corticosteroides (ALAT,2014). No entanto, o mesmo não ocorre quando se avaliam os macrófagos de pacientes com DPOC (Toledo, A.C.; et., al, 2012). As razões para o desenvolvimento de resistência a estes medicamentos em pacientes com DPOC pode ser, pelo menos parcialmente, explicada pela redução da atividade da histona di-acetilase (HDAC) nos macrófagos de pacientes com DPOC (Vieira, R.P.,et. al.,2011).



**Figura 1- Fisiopatologia da DPOC.**

Fonte: [http://www.medicinanet.com.br/acesso-mobile/?frm=/m/conteudos/acp-medicine/5948/doenca\\_pulmonar\\_obstrutiva\\_cronica.htm](http://www.medicinanet.com.br/acesso-mobile/?frm=/m/conteudos/acp-medicine/5948/doenca_pulmonar_obstrutiva_cronica.htm)

### 1.3-Imunopatologia

Finkelstein et al. foram os primeiros a observar o aumento de linfócitos T no parênquima pulmonar de pacientes com DPOC (Abbas, et. al.,2012). Esses autores mostraram inclusive, a existência de correlação entre o número de linfócitos T e áreas de enfisema. Posteriormente, foi demonstrado que tanto os linfócitos T CD4+ (T auxiliares) como os CD8+ (citotóxico) estavam aumentados nas vias aéreas e no parênquima pulmonar dos pacientes com DPOC (Vieira, R.P.,et. al.,2011). Existem dois padrões de resposta das células T CD4: T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2). O primeiro, relacionado com a liberação de interleucina (IL) -2, interferon gama (IFN-g) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-a); enquanto que o segundo está associado à secreção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, à produção de imunoglobulina (Ig) E e IgG4, e

se associa com a ativação de mastócitos e eosinófilos (Silva R.A., et., al.,2010). Este último é o padrão da asma alérgica, por exemplo (Silva R.A., et., al.,2010). Assim como as células T CD4+, as CD8+ também apresentam dicotomia de expressão, neste caso, sendo chamadas de Tc1 (células T citotóxicas do tipo 1) e Tc2 (células T citotóxicas do tipo 2). No primeiro padrão, observa-se produção de IFN-g, mas não de IL-4. No segundo, as células liberam IL-4, mas não INF-g. Os linfócitos T CD4+ e CD8+ estão aumentados no parênquima pulmonar e na parede das vias aéreas de pacientes com DPOC (Bennet R.G. et., al.,2009). Em modelo animal de enfisema induzido pela exposição à fumaça de cigarro foi observado que, além do número de linfócitos T estarem aumentado, havia correlação direta entre esse número e a gravidade da doença pulmonar (Bennet R.G. et., al.,2009).

Na DPOC, o interesse está voltado para o padrão Tc1 das células CD8+, pois vários artigos demonstram uma predominância dessas células no escarro, no LBA e na biópsia dos pacientes, quando comparado aos tabagistas sem limitação do fluxo aéreo e aos voluntários não tabagistas (Costa C. H. et., al., 2009). No entanto, os linfócitos T CD4+ também estão aumentados no parênquima de pacientes com DPOC, especialmente naqueles com doença mais grave (Costa C. H. et., al., 2009). Embora o papel destas células ainda esteja obscuro, é possível que elas tenham importância na manutenção da memória imunológica que perpetuaria o processo mesmo após a suspensão do tabagismo (Costa C. H. et., al., 2009). Linfocitos T CD8+ estão aumentados na parede brônquica e no parênquima pulmonar de pacientes com DPOC quando comparado com tabagistas sem obstrução brônquica (Shumann ,et. al., 2015). Mais ainda, a intensidade da infiltração linfocitária está diretamente relacionada com o grau de obstrução brônquica (Vieira, et., al., 2012). Dessa forma, a proliferação de células T CD8+ no pulmão de tabagistas estaria relacionada com a progressão da

doença obstrutiva. Uma das funções das células T CD8+ é a apoptose de células-alvo, que no caso do enfisema está relacionada com a destruição pulmonar (Vieira, et., al., 2011). Foi demonstrada a relação tanto da apoptose quanto da infiltração de células CD8+ na parede brônquica com a carga tabágica e com a destruição pulmonar em pacientes com DPOC (Toledo, A.C.; et., al, 2012). A polarização da inflamação pulmonar da DPOC em favor do tipo 1 resulta na produção e liberação de um determinado tipo de citocinas, especialmente o IFN-g, liberado pelos linfócitos CD4+ e CD8+, o qual é capaz de ativar os macrófagos, que, por sua vez, passam a produzir uma série de citocinas, incluindo IL-12, que mantém a diferenciação de linfócitos desviada para esse fenótipo (Dawkins, P.A. et., al., 2001). O mecanismo pelo qual os linfócitos T CD8+ se acumulam nas paredes das vias aéreas e no parênquima pulmonar dos pacientes com DPOC ainda não está claro. No entanto, o recrutamento de células para o pulmão deve necessitar da ativação linfocitária que, por sua vez, provavelmente será seguida por adesão e quimiotaxia seletiva (Dawkins, P.A. et., al., 2001). As células T presentes no pulmão apresentam aumento da expressão de receptores CXCR3 e CCR5, relacionados às quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de linfócitos T. As quimiocinas que atuam no receptor CXCR3 são CXCL9, CXCL10 e CXCL11, enquanto que as relativas ao receptor CCR5 compreendem CCL3, CCL4, CCL5 e CCL11 (Abbas, et. al.,2012). Todas têm atividade quimiotóxica de linfócitos (Abbas, et. al.,2012).

A primeira e mais importante anormalidade encontrada nas vias aéreas de pacientes com DPOC é a infiltração celular tanto na parede quanto na luz brônquicas (Toledo, A. C. et., al., 2012). Estudos em animais demonstraram que a exposição à fumaça de cigarro promove a proliferação de neutrófilos nas vias aéreas (Toledo, A. C. et., al., 2012). Utilizando modelo de cobaias, Hulbert et al. observaram a ocorrência



de edema da mucosa brônquica após 30 minutos e incremento de cinco vezes no número de neutrófilos após seis horas de inalação de fumaça de cigarro. Dessa forma, não é surpreendente que vários autores tenham publicado estudos relatando o aumento de neutrófilos no escarro e no LBA de pacientes com DPOC (Toledo, A. C. et., al., 2012). Os neutrófilos estão implicados na liberação de citocinas inflamatórias, mediadores lipídicos e enzimas capazes de promover dano tecidual (Muller T, et. al., 2011). Além disso, podem promover hipersecreção de muco por meio de efeito secretado e pela proliferação de glândulas mucosas (Muller T., et. al., 2011).

Desde o advento da tese de que a destruição pulmonar estaria relacionada ao desequilíbrio entre proteases e anti-proteases, o neutrófilo foi tido como fator importante para desencadear a doença, já que esse desequilíbrio seria mantido através da liberação de enzimas neutrofílicas, o que ocasionaria o aumento de proteases no pulmão (Vieira, et.al.,2012). Estudos em humanos demonstraram o aumento de neutrófilos no pulmão de pacientes com DPOC e relataram o aumento de produtos da elastase na urina e no plasma desses pacientes (Vieira, et.al.,2012). Também foi publicado que o volume de fibras elásticas nos alvéolos e pequenas vias aéreas está reduzido nos pacientes com DPOC, levando à uma diminuição da elastância pulmonar (Vieira, et.al.,2012). No entanto, Rufino et al. demonstraram que a quantidade de fibras elásticas não está diminuída no parênquima pulmonar de pacientes com enfisema quando comparado a controles não tabagistas e sugeriram que as fibras pudessem estar rompidas ou funcionalmente alteradas . A diferença dos dados obtidos pode ser explicada pelas diferentes metodologias empregadas ou pelo perfil de pacientes estudados, mas chamam a atenção para a necessidade de mais estudos. Apesar de vários autores terem relatado o aumento de neutrófilos nas vias aéreas de pacientes com DPOC, nem todos os trabalhos demonstraram diferença

significativa entre o número de neutrófilos recolhidos de tabagistas sem obstrução brônquica e pacientes com DPOC (Rufino , et., al.,2013). Esses achados sugerem que, embora a inflamação neutrofílica esteja constantemente presente nos tabagistas, ela provavelmente representa uma resposta inespecífica das vias aéreas à agressão causada pelo tabagismo, não estando, necessariamente, relacionada à progressão para DPOC (Li X.F,et., al., 2013). Além disso, postula-se que seria necessária a ocorrência de interação com macrófagos e linfócitos T, os quais desencadeariam resposta inflamatória ampliada e anormal apenas na parcela de tabagistas que desenvolveria quadro clínico de DPOC (Li X.F,et., al., 2013).

O papel dos eosinófilos na DPOC é incerto. Alguns autores relataram o aumento destas células no escarro e no LBA dos pacientes com DPOC, enquanto que outros associaram esse aumento a uma melhor resposta ao uso de corticosteroides, à associação com asma ou à ocorrência de exacerbação da doença (Vieira, et.al.,2012). É interessante o fato de que os níveis das proteínas eosinofílicas estão tão aumentados na DPOC quanto na asma, mesmo quando a contagem de eosinófilos é menor nos pacientes com doença obstrutiva brônquica irreversível, sugerindo que as células tenham degranulado e não possam ser vistas ao microscópio (Vieira, et.al.,2012). É possível que esta degranulação aumentada ocorra devido à atuação da elastase neutrofílica, que costuma estar elevada nos pacientes com DPOC e que causa degranulação de eosinófilos (Vieira, et.al.,2012).

#### **1.4-Inflamação**

O processo inflamatório da DPOC envolve várias células inflamatórias e seus mediadores, não se limitando ao aumento de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, mas incluindo também células estruturais dos pulmões (Vieira, R.P. et., al.,2011). Em um modelo de ratos expostos à fumaça de cigarro foi observado que havia aumento do

número de células dendríticas (Vieira, R.P. et., al.,2011). Outros autores observaram o aumento das células dendríticas na parede das vias aéreas de fumantes com ou sem DPOC (Vieira, R.P. et., al.,2011). As células epiteliais podem ser ativadas diretamente pela fumaça de cigarro passando a produzir mediadores inflamatórios como IL-8 e TNF-a (Li X.F,et., al., 2013). Alteradas pelo processo inflamatório crônico que leva à metaplasia escamosa com frequência, é possível que as células epiteliais deixem de exercer seu papel de defesa adequadamente, facilitando a ocorrência de infecções respiratórias e a liberação de citocinas (Li X.F,et., al., 2013). Todo processo inflamatório é feito com a participação de células e de seus mediadores. Entre estes, é importante ressaltar a participação das citocinas no processo inflamatório pulmonar, especificamente na DPOC, as quais estão envolvidas na interação celular (Costa, C.H. , et., al., 2009). Usualmente, são menores do que 80 KDa e podem ser produzidas por diferentes tipos de células (Costa, C.H. , et., al., 2009). As citocinas costumam atuar nas células próximas (função parácrina), embora algumas possam ser efetivas em células distantes (função endócrina) ou ter efeito sobre a própria célula que a produziu (função autócrina) (Royce S.G. et., al., 2014). As citocinas atuam em células-alvo e podem desempenhar muitas funções: ativação e proliferação celular, quimiotaxia de outras células, imunomodulação, liberação de outras citocinas ou mediadores inflamatórios, favorecer o crescimento e a diferenciação celulares, além de apoptose (Royce S.G. et., al., 2014). Estas substâncias costumam ser liberadas em padrões específicos, dependendo da patologia. Assim, o padrão de citocinas liberado na DPOC é diferente do observado em pacientes asmáticos ou em outras doenças inflamatórias (Silva, R.A., et., al., 2010). Como várias citocinas são liberadas ao mesmo tempo, o efeito sinérgico ou antagônico de uma citocina sobre outra resultará no padrão inflamatório de uma determinada patologia. Determinar o papel

de uma citocina na patogenia de uma doença é difícil, já que ela pode ser influenciada (potencializada ou bloqueada) pela ação de outras citocinas liberadas simultaneamente pela mesma célula ou pela célula-alvo após a sua ativação (Silva, R.A., et., al., 2010). As citocinas atuam ligando-se a receptores específicos e regulando a atividade das células-alvo. É interessante notar que os receptores de citocinas são altamente específicos e costumam estar presentes em pequeno número nas células não ativadas (Vieira, R.P. et.,al.,2012). No entanto, este número aumenta rapidamente após a ativação celular. As citocinas podem interferir na expressão de seus próprios receptores tanto na célula que as produziu como nas células-alvo. Algumas citocinas potencializam ou bloqueiam a ação de outras citocinas por meio de sua atuação na expressão dos receptores. Por exemplo, podemos citar o interferon-gama (IFN-g), que pode inibir os receptores de TNF- $\alpha$  em macrófagos ou aumentar a expressão de receptores de IL-1 $\beta$  na asma (Vieira, R.P. et.,al.,2012). Estes importantes mediadores podem ser classificados de acordo com o seu papel no processo inflamatório.

As citocinas pró-inflamatórias são citocinas conhecidas pela sua capacidade de induzir a liberação de outras citocinas, ampliando o processo inflamatório. A mais conhecida é a IL-1, ou fator pirogênico, que está presente em praticamente todos os processos inflamatórios. Ela pode ser liberada por vários tipos de células e induz adesão molecular, expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM) -1 e da molécula de adesão de célula vascular (VCAM) -1 (Wehrmeister, F.C.,et.al.,2011). As citocinas anti-inflamatórias são citocinas liberadas para controlar o processo inflamatório. O principal exemplo deste grupo é a IL-10, que é liberada por monócitos (especialmente linfócitos T reguladores – T regs) e macrófagos em resposta a estímulos inflamatórios. Na asma, sua liberação pelos macrófagos está diminuída,

sugerindo um descontrole do processo inflamatório nesses pacientes. Embora não tenha sido evidenciada uma clara redução desta citocina em pacientes com DPOC, sugere-se que ela tenha papel semelhante ao observado na asma (Wehrmeister, F.C.,et.al.,2011).

As citocinas de 8 a 10 KDa apresentam importante propriedade quimiotática para leucócitos e são denominadas de quimiocinas (Wehrmeister, F.C.,et.al.,2011).

A primeira quimiocina, IL-8, foi descrita em 1987. Desde então, mais de 50 proteínas com esta qualidade foram descritas e agrupadas sob a denominação de quimiocinas (Wehrmeister, F.C.,et.al.,2011).

Quatro grandes famílias foram classificadas, dependendo do número e disposição de moléculas de cisteína na terminação amino da proteína: C, CC, CXC e CC52. As duas maiores famílias e que desempenham papel na patogênese da DPOC são CC e CXC. As quimiocinas da família CC estão envolvidas especialmente com a quimiotaxia de eosinófilos, monócitos e linfócitos T (Vieira, R.P. et. al, 2012). Têm papel importante na asma e também estão presentes em pacientes com DPOC (Vieira, R.P. et. al, 2012). As quimiocinas da família CXC, como IL-8, oncogene relacionado ao crescimento-a (GRO-a) e o ativador neutrofílico derivado do epitélio (ENA-78) são moléculas quimiotáticas de neutrófilos e têm sido estudadas em pacientes com DPOC (Vieira, R.P. et. al, 2012). Outras quimiocinas desta família, como as que se ligam ao receptor CXCR3, recentemente, têm sido descritas como possíveis recrutadoras de linfócitos T ativados e monócitos sanguíneos (Vieira, R.P. et. al, 2012). As quimiocinas exercem sua função acoplando-se à proteína G do receptor expresso na célula inflamatória.

Até o momento, 18 receptores de quimiocinas foram identificados. Os receptores CXCR1 ao CXCR5 interagem com as quimiocinas da família CXC,

enquanto que a família CC consiste de nove receptores (CCR1 a CCR9). Alguns receptores recebem a ligação de apenas uma quimiocina, como ocorre com o receptor CCR8, que se liga à CCL1. Outros receptores são compartilhados por várias quimiocinas (Wehrmeister, F.C., et al., 2011). Esse é o caso, por exemplo, do CXCR3, que se liga a MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 e I-TAC/CXCL11. O contrário também ocorre, com uma quimiocina se acoplando a vários receptores. Assim, RANTES (Regulated on Activation, Normal, T-cell Expressed and Secreted) / CCL5 pode atuar nos receptores CCR1, CCR3 e CCR5 (Wehrmeister, F.C., et al., 2011). Finalmente, deve-se lembrar que os receptores estão presentes em vários tipos de células e que eles são estimulados em algumas situações específicas, como nas doenças inflamatórias (Wehrmeister, F.C., et al., 2011). Através da regulação do trânsito de células inflamatórias em direção aos pulmões, as quimiocinas desempenham um papel fundamental no processo inflamatório da DPOC. Algumas quimiocinas estão sendo estudadas há mais tempo e estão mais claramente implicadas ao processo, enquanto outras desempenham papel ainda incerto. Interleucina (IL) - 8 / CXCL8 É um potente fator quimiotático de neutrófilos e seu nível está aumentado no escarro induzido de pacientes com DPOC em comparação com os controles não tabagistas (Vieira, R.P. et al, 2012). O nível de IL-8 está relacionado ao número absoluto e relativo de neutrófilos no escarro induzido e está especialmente aumentado nos pacientes com deficiência de alfa 1-anti-tripsina e naqueles com exacerbação brônquica (Vieira, R.P. et al, 2011). Oncogênese relacionado ao crescimento (GRO) - a / CXCL1 produzida e liberada por macrófagos alveolares e células epiteliais, GRO-a tem sido implicada na ativação de neutrófilos, monócitos, basófilos e linfócitos T por meio de sua ligação com o receptor CXCR2 (Costa et., al., 2009). Sua concentração está aumentada no escarro, mas não no lavado broncoalveolar de pacientes com

DPOC em comparação com tabagistas e não tabagistas. É capaz de recrutar monócitos, mecanismo pelo qual deve ocorrer o acúmulo de macrófagos alveolares no pulmão de pacientes com DPOC. O ativador neutrofílico derivado do epitélio (ENA)-78/CXCL5, assim como o GRO-a, atua por meio do receptor CXCR2 e está aumentado no LBA de pacientes com DPOC em relação a controles não tabagistas, embora em níveis não superiores àqueles encontrados em fumantes (Costa et., al., 2009). Foi relatado que a sua expressão nas células epiteliais está aumentada durante as fases de exacerbação da DPOC (Costa et., al., 2009). Quimiocinas dos receptores CXCR1 e CXCR2 Estes receptores estão presentes principalmente em neutrófilos e monócitos. CXCL6 e CXCL8 são quimiocinas que se ligam aos receptores e estão envolvidas com processos inflamatórios neutrofílicos. A expressão dos receptores CXCR1 e CXCR2 está aumentada nos pacientes com DPOC (Vieira, R.P.2011). A inibição desses receptores está relacionada à diminuição da inflamação neutrofílica em modelo experimental. O receptor CXCR3 é compartilhado pelas quimiocinas monocina induzida pelo interferon (IFN)-g ,(MIG / CXCL9), proteína 10 induzida pelo IFN (IP-10 / CXCL10) e fator quimiotático de célula T induzido pelo interferon (I-TAC / CXCL11) e é expresso pelos linfócitos T CD4+ e CD8+, linfócitos B, monócitos, macrófagos e células epiteliais (Vieira, R.P.2011).

O mecanismo pelo qual os linfócitos T se acumulam no parênquima pulmonar e na parede das vias aéreas de pacientes com DPOC ainda não está claro. No entanto, é provável que linfócitos presentes na circulação sejam ativados e, posteriormente, sofram a ação de quimiocinas, mecanismo pelo qual eles seriam recrutados para o pulmão. Algumas evidências sugerem a participação de quimiocinas do receptor CXCR3 nesse processo. Pacientes com DPOC apresentam aumento da expressão do receptor CXCR3 nos linfócitos T e macrófagos alveolares. Existe

aumento da expressão de IP-10/CXCL10 nas células epiteliais e músculo liso no parênquima pulmonar de pacientes com DPOC, o que poderia contribuir para o acúmulo de células T, já que elas apresentam o receptor CXCR3, que se liga à IP-10/CXCL10. Os macrófagos alveolares e as células dendríticas também produzem as quimiocinas do receptor CXCR3 (MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 e I-TAC/CXCL11) e também poderiam participar do recrutamento linfocitário. Como os receptores CXCR3 também estão presentes nos monócitos do sangue periférico, é possível que estas quimiocinas também estejam relacionadas com o acúmulo de macrófagos alveolares, já que os monócitos são os precursores destas células. Costa et al. observaram aumento das três quimiocinas do receptor CXCR3 no escarro induzido recolhido de pacientes com DPOC quando comparado com tabagistas sem doença obstrutiva e controles não tabagistas, sugerindo a participação destas quimiocinas na inflamação crônica presente apenas em indivíduos que desenvolvem obstrução brônquica ().

Quimocinas de outros receptores CXC, as quimiocinas CXCL12 (Fator 1 derivado da célula do estroma) e CXCL13 (Quimiocina 1 da célula B) se ligam respectivamente aos receptores CXCR4 e CXCR5 (Costa et al.,2009). O primeiro está presente nos linfócitos T e células epiteliais pulmonares (Costa et., al.,2009). Além, disso a inibição seletiva deste receptor diminui a reação inflamatória em camundongos (Costa et., al.,2009). O receptor CXCR5 está presente nas células B e, como estas células estão aumentadas nos pacientes com DPOC grave, acredita-se que possa haver participação do receptor CXCR5 na doença grave (Vieira R.P., 2011). No entanto, não está estabelecida nem a participação destes receptores nem a do CXCR6, expresso pelos linfócitos T, que também apresentam os receptores CXCR3 e CCR5, no processo inflamatório da DPOC (Vieira R.P., 2011). O receptor CCR5, que pode ser encontrado nos linfócitos T CD4 e CD8, monócitos e macrófagos, é



utilizado pelas quimiocinas RANTES, proteína inflamatória macrofágica (MIP)-1a / CCL3 e MIP-1b/ CCL4. Assim como acontece com o receptor CXCR3, a expressão do CCR5 está aumentada nos macrófagos alveolares e nos linfócitos T presentes no parênquima pulmonar de pacientes com DPOC (Vieira R.P., 2011). Estudos feitos com imunohistoquímica demonstraram que RANTES / CCL5 está aumentada em outros processos inflamatórios que cursam com polarização do tipo Th1, como na inflamação de tonsilas, certos tumores e na rejeição de transplantes renais (Costa et. al.,2009). Assim como as quimiocinas do receptor CXCR5, RANTES/CCL5 está aumentada no escarro induzido de pacientes com DPOC quando comparado com os controles tabagistas e não tabagistas (Vieira R.P., 2011). No entanto, a interação entre estas quimiocinas e a real quimiotaxia de células inflamatórias para as vias aéreas de pacientes com DPOC ainda não foi demonstrada. Vários estudos observaram que a expressão dos receptores CXCR3 e CCR5 está aumentada na inflamação com fenótipo 1, como ocorre na DPOC. Bonechi et al. verificaram que ao estimular a produção de Th1 e Th2 por meio da exposição de linfócitos de cordão umbilical à presença de IL-12 (potencializador do padrão Th1) e inibidor de IL-4 ou à IL-4 (potencializador do padrão Th2) e inibidor de IL-12, a produção de citocinas era bastante polarizada. Os linfócitos diferenciados no padrão Th1 produziam preferencialmente IFN-g enquanto que, ao contrário, as células do padrão Th2 produziam muito mais IL-4 do que IFN-g. Através da análise da expressão de RNA mensageiro, os autores estudaram os principais receptores de quimiocinas nas duas populações celulares. A expressão do receptor CCR5 foi quase cinco vezes maior nos linfócitos do fenotipo 1 em comparação com o outro grupo. Da mesma forma, a expressão do receptor CXCR3 foi quase sete vezes maior nas células do fenotipo 1. Estes dados sugerem que os receptores CCR5 e CXCR3 são preferencialmente

expressos pelas células do fenotipo 1, enquanto que a expressão de CCR4 é mais vista na inflamação tipo Th2. Dessa forma, as células inflamatórias que expressam os receptores CXCR3 e CCR5 estariam ativadas no pulmão de pacientes com DPOC e estes receptores seriam capazes de atrair suas quimiocinas (MIG, IP-10 e I-TAC se ligando ao receptor CXCR3 e RANTES, MIP-1a e MIP-1 $\beta$  ao receptor CCR5). De fato, alguns autores conseguiram demonstrar que pacientes com DPOC apresentam aumento do número de células que expressam CXCR3 e CCR5 no parênquima pulmonar. Acredita-se, ainda, que as quimiocinas estariam relacionadas ao recrutamento de leucócitos presentes na circulação em direção ao local de injúria, no caso, o parênquima pulmonar e as vias aéreas de tabagistas. A vinda dessas células com o mesmo perfil inflamatório (tipo 1) seria um fator perpetuador da inflamação pulmonar e poderia ser o diferencial determinante que levaria à destruição pulmonar em uma parcela de fumantes. No entanto, poucos autores conseguiram demonstrar fatos que corroborassem esta teoria. Cole e et al. demonstraram que I-TAC é um potente recrutador de linfócitos T ativados, monócitos e neutrófilos. Thorley et al. sugeriram o Burns et al. verificaram o aumento de influxo de células T recrutadas em direção à adventícia e à média de artérias de um modelo de rejeição de transplante coronariano. Essas células expressavam CXCR3 e CCR5. Apesar de já existir publicações sugerindo o aumento da produção dos ligantes dos receptores CXCR3 e CCR5 no pulmão de pacientes com DPOC, ainda não foi possível confirmar que as células da circulação possam ser recrutadas para o pulmão por meio do efeito dessas quimiocinas.

Proteínas como o fator de crescimento plaquetário (PDGF), o fator de crescimento transformador (TGF)- $\beta$  e o fator de crescimento epidérmico (EGF) são exemplos de citocinas que exercem influência na proliferação de células estruturais como os

fibroblastos e células musculares lisas das vias aéreas. Por meio da renovação da matriz proteica podem estar envolvidas no processo de remodelamento brônquico dos pacientes com DPOC.

### **1.5-Via de sinalização da JAK/STAT**

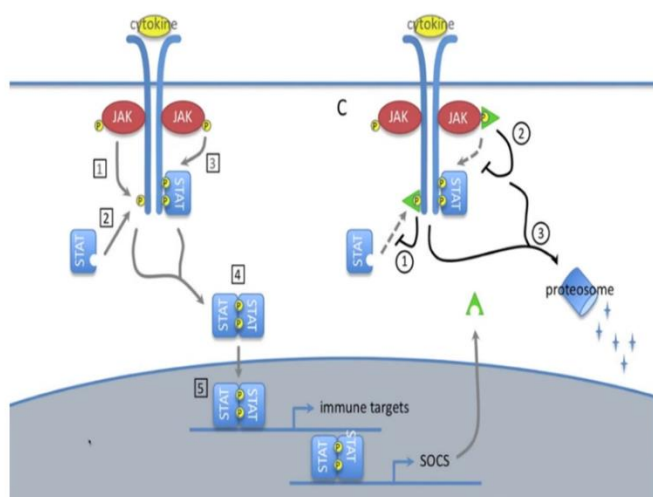
Já a via de transcrição Janusquinase trata-se de um grupo constituído de 4 proteínas, que são conhecidas como JAK-1, JAK-2 e JAK-3, amplamente expressas, ao passo que JAK-3 é principalmente de origem hematopoiética. As proteínas JAK, por sua vez, permitem a fosforilação de STAT3 (signal transducer and activator of transcription).

A translocação de STAT3 para o núcleo induz uma nova expressão gênica. Ou seja, transcorridos poucos minutos da ativação do receptor de interleucina-6 são produzidas a transfosforilação e a ativação de JAKs. Posteriormente, as porções terminais de gp130 são fosforiladas, provocando a mediação do recrutamento das proteínas STAT3, for

mando-se um dímero. STAT3 é ativado no citoplasma, mas o local em que realmente exerce sua função é o núcleo. A dimerização de STAT3 ativada permite internalizá-la no núcleo celular. Uma vez no núcleo, STAT3 favorece a transcrição de numerosos genes, incluindo aqueles que codificam para a síntese de proteínas que intervêm na fase aguda da doença. Além de STAT3, existem outros 6 genes STAT, todos localizados em 3 clusters cromossômicos, sugerindo que a família STAT tenha evoluído a partir de fenômenos de duplicação gênica. A regulação da síntese de STAT não parece desempenhar um papel importante na regulação do sinal mediado por citocinas. Entretanto, a atividade STAT é regulada principalmente em consequência das modificações pós-transducionais que ocorrem na proteína. As proteínas STAT são ativadas através dos receptores de citocinas, como é o caso da ativação de STAT3, que é produzida a partir de qualquer um dos membros da família IL-6. De fato,

todas as proteínas STAT apresentam uma estrutura terciária altamente preservada e dispõem de um domínio comum SH2, através do qual se ligam ao receptor fosforilado da tirosina-quinase. A IL-6 é sintetizada em um amplo número e tipos celulares e, assim, seu receptor é expresso igualmente em diversas células. Estima-se que existam centenas de milhares de moléculas IL-6R presentes em cada célula. Além disso, os linfócitos T e B também expressam receptores para interleucina-6, embora a regulação da expressão de IL-6R apresente diferenças entre ambos os tipos de células. Os sistemas de sinalização de IL-6 são regulados por um mecanismo de feedback negativo, pelos supressores de sinalização de citocinas (SOCS, Suppressors of Cytokine Signalling) e pelas proteínas inibidoras das proteínas STATs ativas (PIAS). A interação IL-6/IL-6R ativa a STAT3, que estimula a expressão do gene de SOCS-1. A molécula SOCS-1 liga-se, então, ao complexo IL-6/IL-6R através de JAK, atuando como um regulador negativo da transdução dos sinais, mediada por gp130, SOCS-1, SOCS-2 e SOCS-3 são induzidos por várias citocinas, incluindo IL-6, IFN- $\alpha$ , IL-4 e G-CSF e todas geram a mesma resposta: a inibição da via JAK/STAT. SOCS-1 interage diretamente com JAKs e, portanto, inibe sua atividade catalítica (suprime a transdução dos sinais, mediada por gp130), ao passo que SOCS-3 inibe a sinalização ao ligar-se diretamente ao receptor de interleucina-6. Trabalhando em modelos em animais experimentais se observou como os ratos com deficiência de expressão de SOCS-1 mantinham intacto o mecanismo regulador do sinal de IL-6, deixando evidente que SOCS-3 é considerado um inibidor crucial do sinal de IL-6, in vivo. A família PIAS é composta de um grupo de proteínas de expressão constitutiva e tem um efeito regulador negativo das STATs. PIAS-3 é associada especificamente à proteína STAT-3 ativada, mas não se associa à STAT-1, levando a um bloqueio de todos os genes (proteínas da fase aguda) cuja transcrição seja mediada por STAT-3. PIAS-3 é uma

molécula especialmente bem conhecida, a expressão constitutiva das proteínas PIAS torna seu papel fisiológico muito diferente do papel atribuído às proteínas SOCS, cuja indução por citocinas é um processo transitório. Contudo, a relevância funcional de qualquer uma dessas 2 famílias de proteínas ainda precisa ser mais pesquisada.



**Figura 2 - Via de transcrição JAK-STAT**

Fonte: <https://www.studyblue.com/notes/n/gmd-aula-2/deck/995057>

### 1.6- Treinamento Físico Aeróbico

Como parte importante de programas de reabilitação, o treinamento físico aeróbico (TFA) é altamente recomendado e é atualmente considerado o principal componente de um programa de reabilitação pulmonar. (Jardim J.R, 2013) Estudos avançaram positivamente, demonstrando os benefícios proporcionados pelo exercício físico, quando este ofertado de modo adequado às necessidades individuais de cada sujeito. (Jardim J.R, 2013)

O (TFA) tem como objetivos proporcionar a diminuição das incapacidades física e psicológica causadas pela doença respiratória através da melhoria da aptidão física, mental e conseqüentemente da performance dos pacientes DPOC (Jardim J.R, 2013),

proporcionando a reintegração social máxima deste paciente com a menor incapacidade possível. Atualmente, cada vez mais atenções estão sendo dispensadas ao paciente portador de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), pois importantes resultados têm sido obtidos em programas complexos de reabilitação. (Jardim J.R, 2013)

Além disso, estudos experimentais têm revelado que o treinamento aeróbio de intensidade leve e moderada desencadeia uma importante resposta anti-inflamatória nos pulmões de camundongos com inflamação pulmonar pela DPOC (Jardim J.R, 2013) e que esses efeitos anti-inflamatórios do treinamento aeróbio tem repercussões importantes, como diminuição do remodelamento pulmonar, resultando em melhora das propriedades mecânicas dos pulmões. (Vieira, R.P.,2013)

Finalmente, alguns estudos têm demonstrado que o exercício aeróbio modula de alguma forma a expressão de SOCS, JAK e STAT (Vieira, R.P.,2013). Um recente estudo de Yaspelkis et al demonstraram que o treinamento aeróbio realizado cronicamente em ratos reduziu a expressão de SOCS3 no músculo esquelético induzida por dieta com alto teor de lipídeos, sugerindo que o TFA pode modular a expressão de SOCS (Vieira.R.P.,2012). Por outro lado, um estudo de Spangenburg et al demonstraram que o TFA realizado cronicamente em ratos aumentou a expressão de SOCS3, estimulando a liberação de IL-6 pelos músculos esqueléticos (Vieira, R.P.,2013), citocina para a qual é atribuído o papel de iniciar o processo antiinflamatório mediado pelo TFA (Vieira, R.P.,2013). Entretanto, a grande maioria desses estudos é específica sobre os efeitos do exercício sobre a expressão de SOCS, JAK e STAT nos músculos esqueléticos e até o momento nenhum estudo avaliou os efeitos do TFA sobre a expressão de SOCS, JAK e STAT nos pulmões, sejam em condições fisiológicas ou em condições patológicas (Vieira R.P., 2012).

## **2. Objetivos**

### **2.1– Geral**

O presente estudo foi guiado pelo objetivo de avaliar os efeitos do TFA em um modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica junto ao possível papel da via de sinalização SOCS-JAK-STAT mediando os efeitos promovidos pelo TFA.

### **2.2– Específicos**

Afim de ampliar os achados pretendidos com o objetivo proposto, foram avaliados os efeitos do TFA no lavado bronco alveolar, nos níveis de celularidade e através da presença de citocinas pró e anti-inflamatórias, além do remodelamento pulmonar. No presente estudo, a proteína STAT3 foi avaliada no tecido pulmonar.

### **3. Método**

#### **3.1– Delineamento do estudo**

Os animais foram obtidos no biotério de criação da Universidade de São Paulo e foram mantidos em condições controladas de umidade (50%-60%), luminosidade (12h claro/12 h escuro) e temperatura (22°C - 25°C). Foram utilizados 32 Camundongos (C57Bl/6), machos, pesando aproximadamente 20 gramas, os quais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

1. Controle (Control; não submetido a treinamento físico e não submetido à fumaça de cigarro), 2. Exercício (Exe; submetido a treinamento físico e não submetido à fumaça de cigarro), 3. DPOC (DPOC; não submetido a treinamento físico e submetido à fumaça de cigarro), 4. DPOC+Exercício (DPOC+Exe; submetido à fumaça de cigarro e submetido a treinamento físico).

#### **3.2- Modelo experimental de DPOC**

A indução experimental de DPOC foi realizada pela inalação de fumaça de cigarro comercial (alcatrão 13,0 mg, nicotina 1,10 mg, monóxido de carbono 10 mg), onde os animais foram fumantes ativos, inalando a fumaça de 14 (quatorze) cigarros por dia, duas sessões diárias de 30 minutos, seis dias por semana, durante 90 dias. Foi utilizada uma caixa de plástico, com tampa acoplada a um sistema de Venturi adaptado (Harvard). Cada cigarro queimou em torno de 4 min. Somando o total de aproximadamente 30 min por sessão e 1 h por dia (Figura 3).





**Figura 3- Figura ilustrativa da caixa de exposição à fumaça de cigarro.**

### **3.3- - PROTOCOLO**

#### **3.3.1. Modelo de treinamento físico aeróbio como intervenção terapêutica**

Os animais foram adaptados em esteira ergométrica para camundongos (Imbramed, RS, Brasil) durante 3 dias (0,5km/h) por 15 minutos.(Vieira RP et al 2007). No dia seguinte foram submetidos ao teste de esforço conforme previamente descrito por nosso grupo (Vieira RP et al 2007). O teste de esforço foi repetido ao final do protocolo para avaliar quanto os animais melhoraram ou não o condicionamento físico. Os animais foram treinados a uma intensidade leve, correspondendo a 50% da máxima velocidade alcançada no teste de esforço .(Vieira RP et al 2007). O treinamento de intensidade leve foi realizado durante 4 semanas, 5 vezes por semana, 1 hora por sessão de treinamento, sendo iniciado somente no dia 61, uma vez que ao 60° dia, os animais submetidos à inalação de cigarro já apresentavam as características clássicas

da DPOC (inflamação e remodelamento das vias aéreas e alargamento dos espaços alveolares – enfisema).

### **3.4-Avaliações**

#### **3.4.1--Coleta de Sangue**

Após anestesia foi realizada uma incisão na região abdominal e através da veia cava inferior coletado entre 0,5 ml e 1,0 ml de sangue. O sangue coletado foi armazenado em eppendorf e utilizado 90 µl para contagem total de células em Câmara de Neubauer, o restante foi centrifugado a 3000 RPM a 4°C durante 10 min. O soro suspenso foi armazenado em tubo eppendorf a -70°C para análise dos níveis de citocinas por ELISA.

#### **3.4.2-Avaliação da inflamação pulmonar pelo lavado broncoalveolar (LBA)**

Após anestesia com ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) foi feita a traqueotomia, os animais foram canulados e os pulmões lavados com 1,5 ml de PBS. O volume do lavado recuperado foi centrifugado a 900g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -70°C para análise das citocinas por meio de ELISA. O botão celular foi ressuspendido em 1 ml de PBS e a determinação do número de células totais no LBA foi realizada por meio de contagem na Câmara de *Neubauer*. Alíquotas do material ressuspendido foram utilizadas para preparação de lâminas de *cytospin* as quais foram coradas com May-Grunwald-Giemsa (onde 300 células foram contadas para a determinação da contagem diferencial).

#### **3.4.3- Avaliação dos níveis de citocinas no LBA e soro por ELISA**

Os níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, e IL-10) e quimiocina (CXCL1/KC) no sobrenadante do LBA foram avaliados através dos kits de ELISA da empresa *Biolegend e RD SYSTEMS* conforme instruções do fabricante.

#### **3.4.4- Avaliação da inflamação e remodelamento das vias aéreas por histologia**

Os pulmões foram removidos cuidadosamente em bloco e foram fixados em formaldeído 10% e submetidos ao processamento histológico de rotina. As lâminas de 5µm foram coradas com picrossírius para detecção das fibras de colágeno e com hematoxilina e eosina para avaliação do alargamento alveolar (destruição dos septos alveolares). A análise quantitativa do acúmulo de fibras de colágeno na parede das vias aéreas foi realizada através da técnica morfométrica descrita por (Vieira et al., 2007). A análise do alargamento alveolar foi realizada através da técnica morformétrica descrita por (Lopes 2007). Os parâmetros morfológicos foram avaliados através do software Image Pró Plus (versão 4.5, NIH, Maryland, EUA).

#### **3.4.5- Avaliação da expressão da proteína STAT 3**

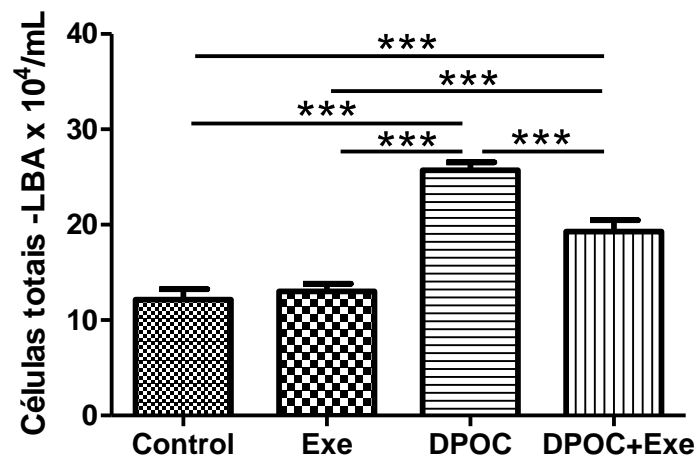
Foi avaliada a presença da proteína STAT-3 na sua forma integral (STAT3) e também na forma fosforilada (p-STAT3), nas células epiteliais das vias aéreas e também pelos leucócitos no parênquima pulmonar, por meio da técnica de imunohistoquímica, com posterior análise morfométrica, conforme descrito por (Vieira et al 2008; Vieira et al 2010).

#### **3.5- Análise estatística**

Os dados foram analisados através do software Graph Pad Prism 5.0 (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% ( $p < 0.05$ ).

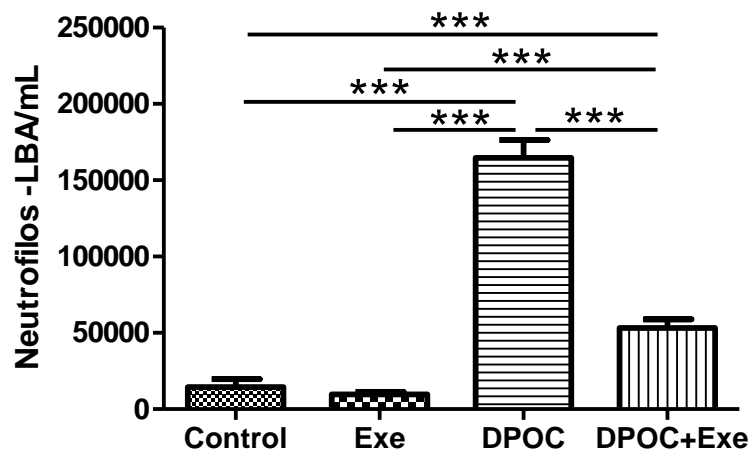
#### 4. Resultados

**Figura 4** - Efeitos do TFA sobre o número de células totais no LBA quando analisada mostrou-se aumentada no grupo DPOC, quando comparada aos demais, comprovando a efetividade do modelo experimental adotado (\*\* $p < 0,001$ ). Em contrapartida, o grupo DPOC+Exercício apresentou a diminuição das células totais em relação ao grupo DPOC somente sensibilizado (\*\* $p < 0,001$ )



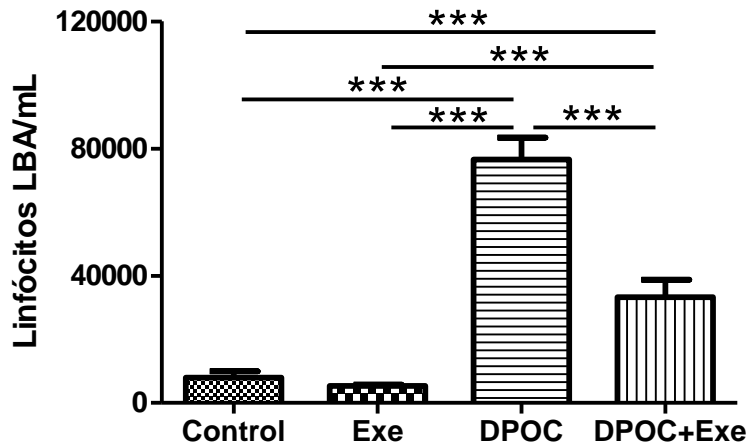
\*\* $p < 0,001$

**Figura 5** - Efeitos do TFA sobre o número de Neutrófilos no LBA não foram observadas alterações entre os grupos não sensibilizados. O grupo sensibilizado DPOC apresentou o aumento da neutrofilia quando comparado aos demais grupos experimentais.



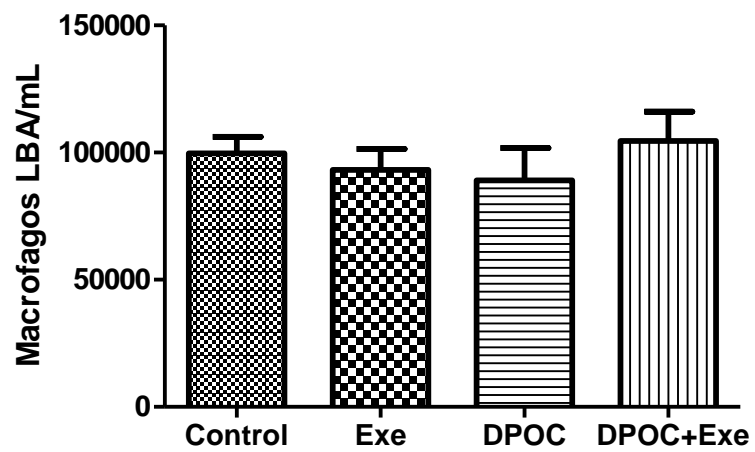
(\*\*\*p<0,001)

**Figura 06** - Efeitos do TFA sobre o número de Linfócito no LBA não foram observadas diferenças entre os grupos não sensibilizados . A sensibilização ao DPOC aumentou neste grupo o número de linfócitos em relação ao Controle (\*\* $p < 0,001$ ). No entanto, o grupo DPOC+Exercício apresentou diminuição no mesmo parâmetro analisado quando comparado ao grupo DPOC .

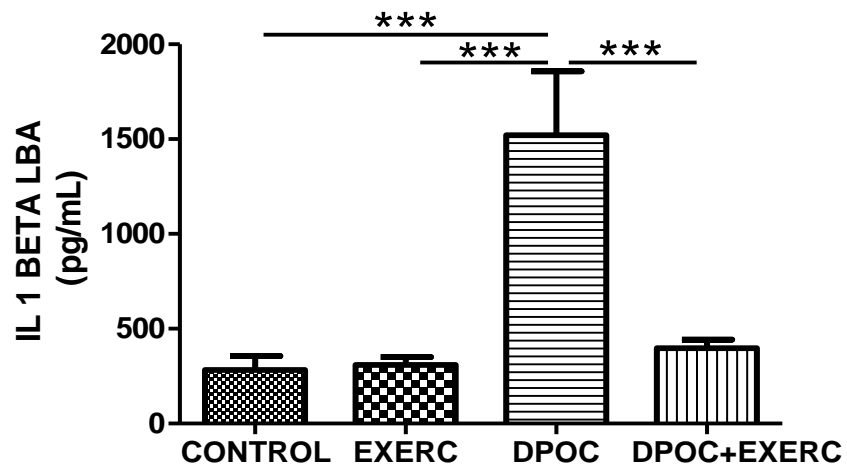


\*\*\* $p < 0,001$

**Figura 7** - Efeitos do TFA sobre o número de Macrófago no LBA . O número de macrófagos não apresentou diferença dentre os grupos experimentais analisados



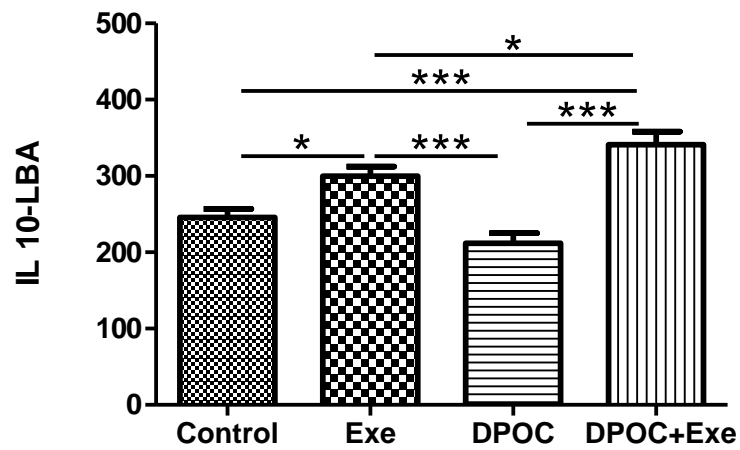
**Figura 8** - Efeitos do TFA sobre o número de IL-1 Beta no LBA. A citocina pró-inflamatória IL-1beta no LBA se mostrou aumentada no grupo DPOC em relação aos demais (\*\* $p < 0,001$ ). Neste sentido, o treinamento físico aeróbio contribuiu com a inibição do aumento deste parâmetro inflamatório no grupo sensibilizado (DPOC+Exercício) quando comparado ao grupo DPOC (\*\* $p < 0,001$ )



\*\* $p < 0.001$ .

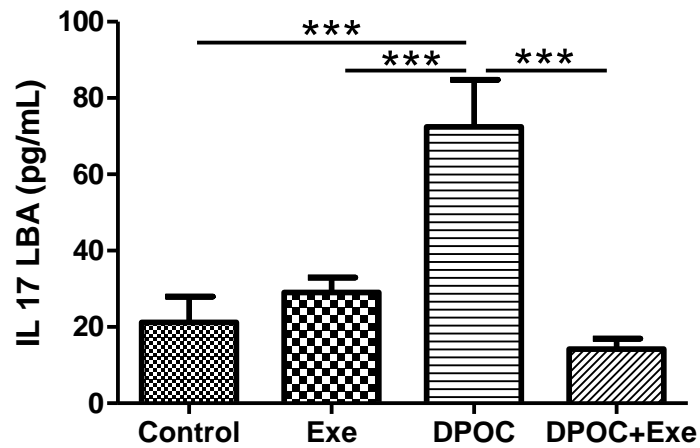


**Figura 9-** Efeitos do TFA sobre o número de IL-10 no LBA. A interleucina 10 no lavado bronco-alveolar mostrou que treinamento físico aeróbio modificou os níveis dessa citocina nos grupos Exercício e DPOC+Exercício. Quando comparados, o grupo DPOC+Exercício demonstrou-se maior prevalência em relação ao grupo somente sensibilizado DPOC (\*\* $p < 0,001$ ).



\*\* $p < 0,001$

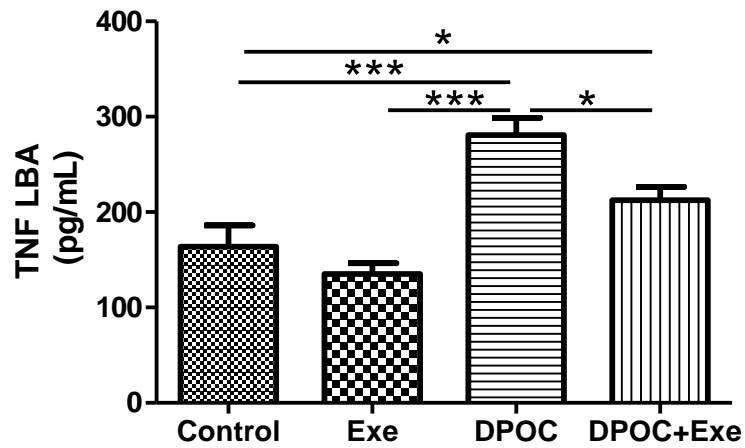
**Figura 10** - Efeitos do TFA sobre o número de IL-17 no LBA. A citocina pró-inflamatória IL-17 quando analisada no LBA mostrou-se aumentada no grupo DPOC, quando comparada aos demais, comprovando a efetividade do modelo experimental adotado ( $***p<0,001$ ). Em contrapartida, o grupo DPOC+Exercício apresentou positivamente a diminuição desta citocina em relação ao grupo DPOC somente sensibilizado ( $***p<0,001$ ).



$***p<0,001$

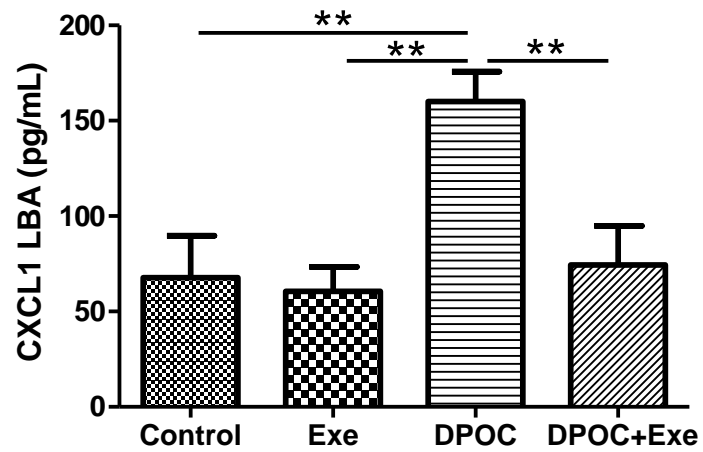
**Figura 11-** Efeitos do TFA sobre o número de TNF no LBA. O treinamento físico aeróbio provocou pequenas alterações nos animais não sensibilizados em relação à citocina TNF- $\alpha$  no LBA. Embora o grupo DPOC tenha demonstrado o aumento no nível desta citocina quando comparado ao grupo DPOC+Exercício.

\* $p < 0,05$



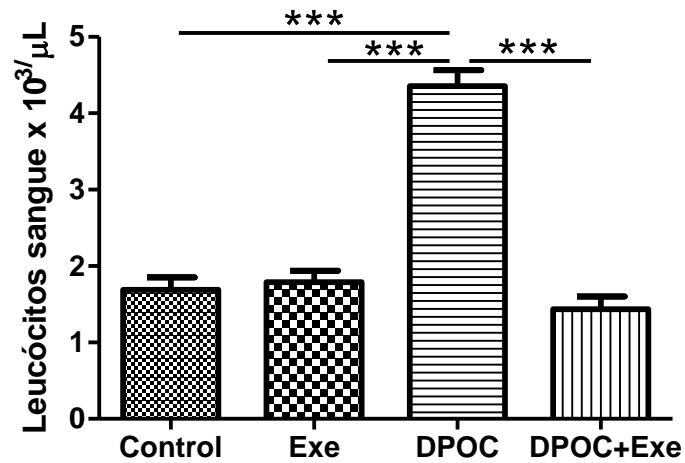
\* $p < 0,05$

**Figura 12** - Efeitos do TFA sobre o número de CXCL1 no LBA. A CXCL1 avaliada no LBA apresentou alterações nos grupos não sensibilizados. O grupo sensibilizado ao DPOC demonstrou alta prevalência de CXCL1, enquanto o grupo DPOC+Exercício demonstrou a diminuição em relação sobre o mesmo parâmetro analisado (\*\* $p < 0,01$ )



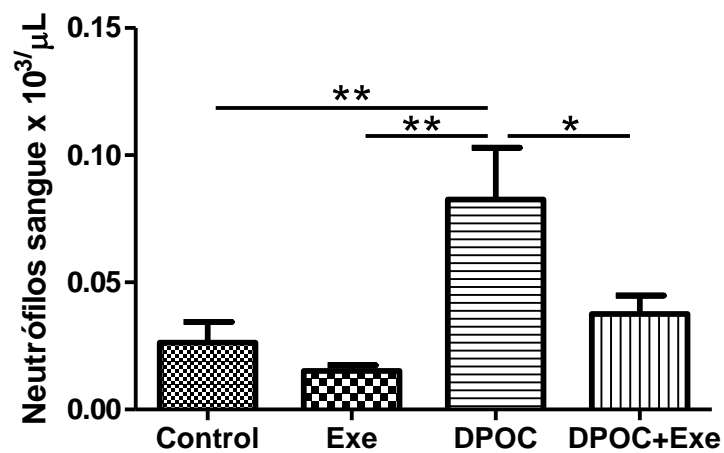
\*\* $p < 0,01$

**Figura 13** - Efeitos do TFA sobre o número de Leucócitos no sangue. O número de Leucócitos no sangue se mostrou aumentada no grupo DPOC em relação aos demais (\*\* $p < 0,001$ ). Neste sentido, o treinamento físico aeróbio contribuiu com a inibição do aumento destas células no grupo sensibilizado (DPOC+Exercício) quando comparado ao grupo DPOC (\*\* $p < 0,001$ )



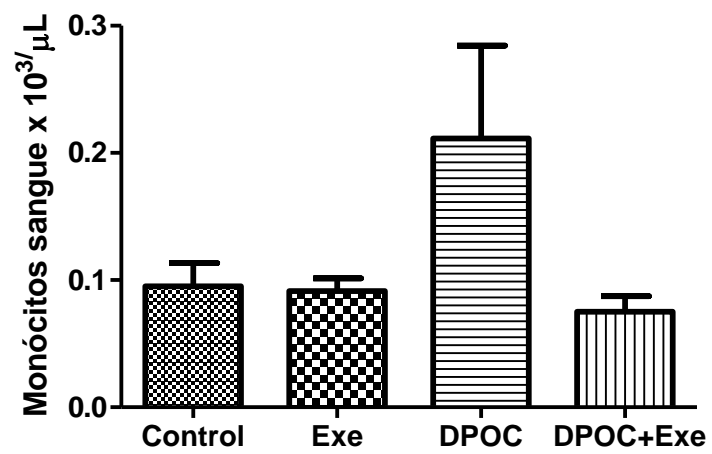
\*\* $p < 0,001$

**Figura 14** - Efeitos do TFA sobre o número de Neutrófilos no sangue. Houve uma pequena diferença no número de neutrófilos no sangue entre os grupos não sensibilizados (\*\* $p < 0,01$ ) A sensibilização ao DPOC aumentou neste grupo o número de neutrófilos em relação ao Controle. No entanto, o grupo DPOC+Exercício apresentou diminuição no mesmo parâmetro analisado quando comparado ao grupo DPOC.

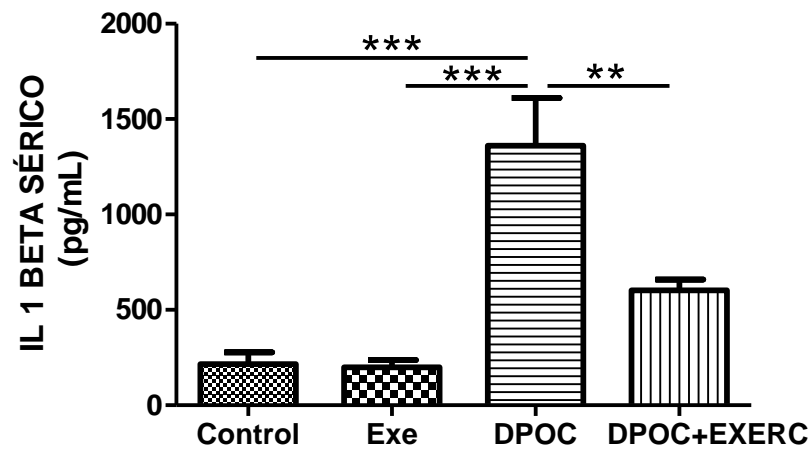


\*\* $p < 0,01$

**Figura 15** - Efeitos do TFA sobre o número de Monócitos no sangue. Não foram observadas diferenças no número de monócitos entre todos os grupos.



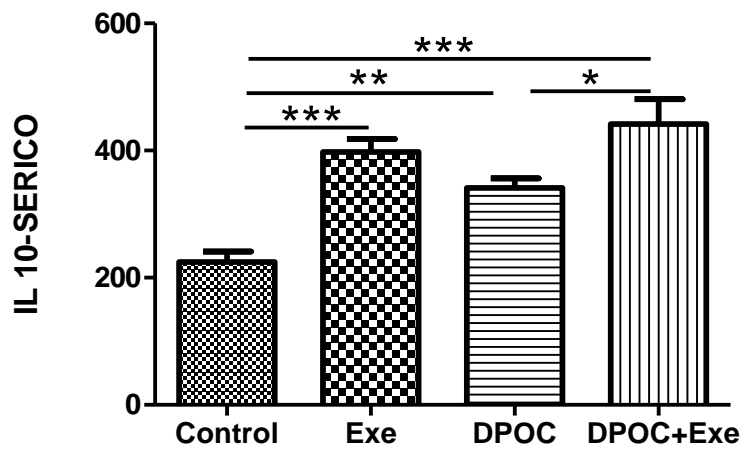
**Figura 16** - Efeitos do TFA sobre o número de IL-1 $\beta$  no soro. A citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  no soro se mostrou aumentada no grupo DPOC em relação aos demais (\*\* $p < 0,001$ ). Neste sentido, o treinamento físico aeróbio contribuiu com a inibição do aumento deste parâmetro inflamatório no grupo sensibilizado (DPOC+Exercício) quando comparado ao grupo DPOC (\*\* $p < 0,01$ )



\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ .

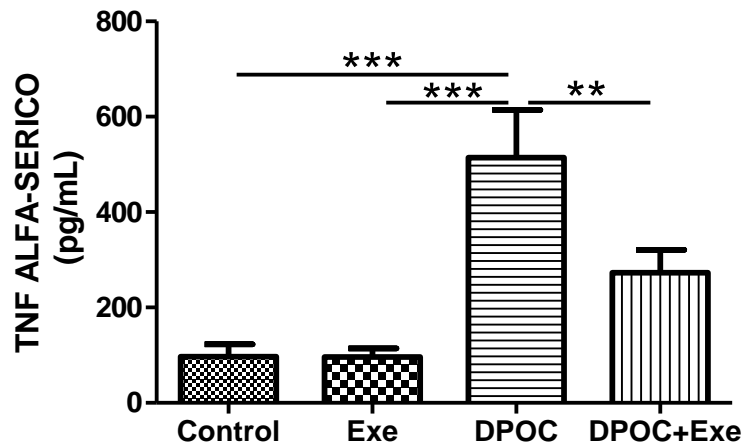


**Figura 17-** Efeitos do TFA sobre o número de IL-10 no soro. O treinamento físico aeróbio modificou os níveis da citocina IL-10 no soro dos grupos Controle, Exercício e DPOC+Exercício. Quando comparados, o grupo Exercício demonstrou o aumento desta citocina em relação aos grupos sensibilizados (\*\* $p < 0,01$ ).



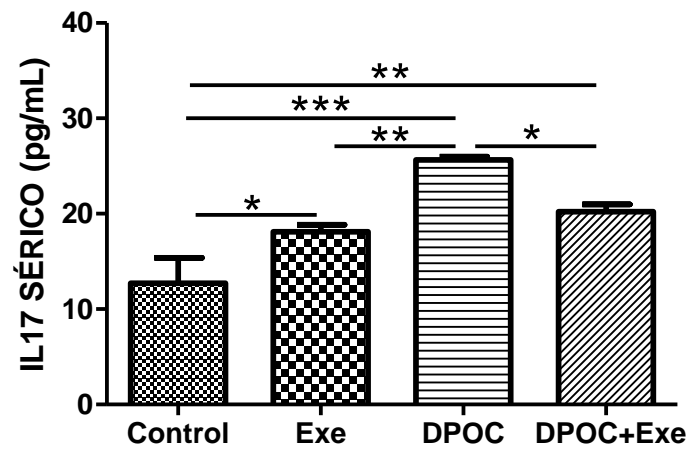
\*\* $p < 0,01$

**Figura 18** - Efeitos do TFA sobre o número de TNF ALFA no soro. Não foram observadas diferenças no número dessa citocina no soro entre os grupos não sensibilizados. A sensibilização ao DPOC aumentou neste grupo o número de citocina TNF Alfa em relação ao Controle (\*\* $p < 0,001$ ). No entanto, o grupo DPOC+Exercício apresentou diminuição no mesmo parâmetro analisado quando comparado ao grupo DPOC (\*\* $p < 0,01$ ).



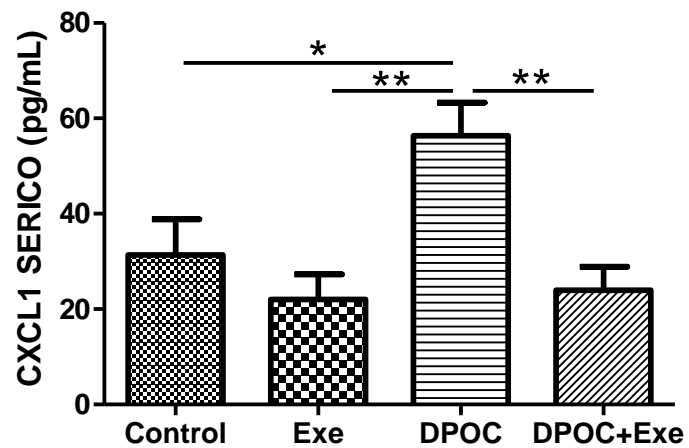
\*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$

**Figura 19** - Efeitos do TFA sobre o número de IL-17 no soro. O grupo DPOC apresentou maior prevalência da citocina IL-17 quando comparado ao Controle (\*\* $p < 0,01$ ). No entanto, este aumento se mostrou atenuado no grupo DPOC+Exercício quando comparado ao DPOC (\* $p < 0,05$ ).



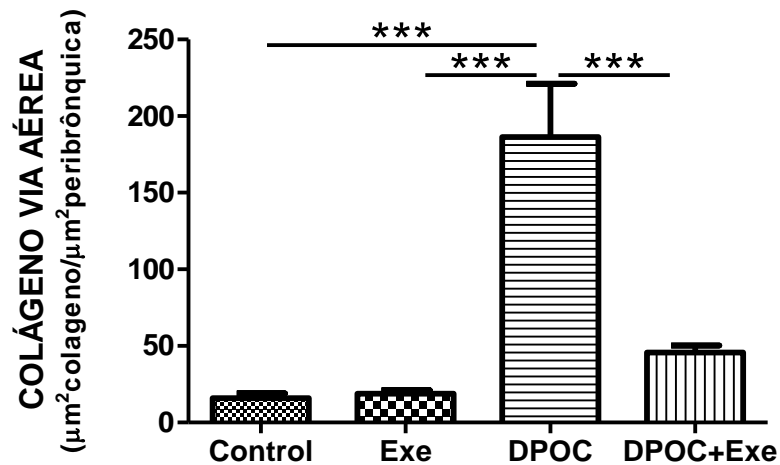
\*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$

**Figura 20** - Efeitos do TFA sobre o número de CXCL1 no soro. A CXCL1 avaliada no soro apresentou alteração nos grupos não sensibilizados. O grupo sensibilizado ao DPOC demonstrou alta prevalência de CXCL1, enquanto o grupo DPOC+Exercício demonstrou a diminuição em relação sobre o mesmo parâmetro analisado (\*\* $p < 0,01$ )



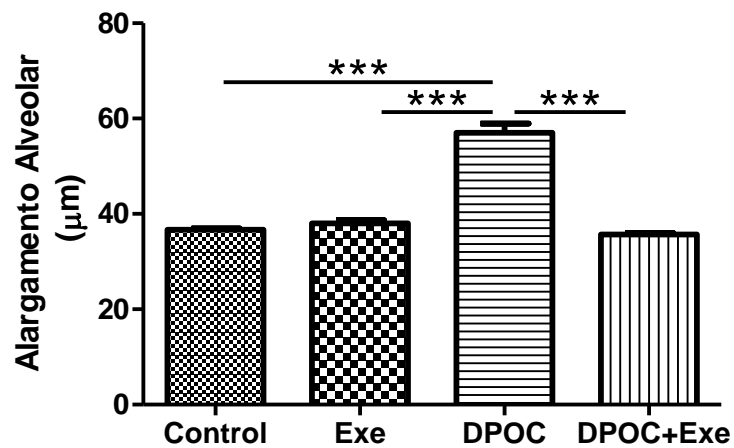
\*\* $p < 0,01$

**Figura 21** - Efeitos do TFA sobre o número de colágeno na Via Aérea. Não foram observadas diferenças no número de colágeno na via aérea entre os grupos não sensibilizados. A sensibilização ao DPOC aumentou neste grupo o número de colágeno na via aérea em relação ao Controle (\*\* $p < 0,001$ ). No entanto, o grupo DPOC+Exercício apresentou diminuição no mesmo parâmetro analisado quando comparado ao grupo DPOC (\*\* $p < 0,001$ ).



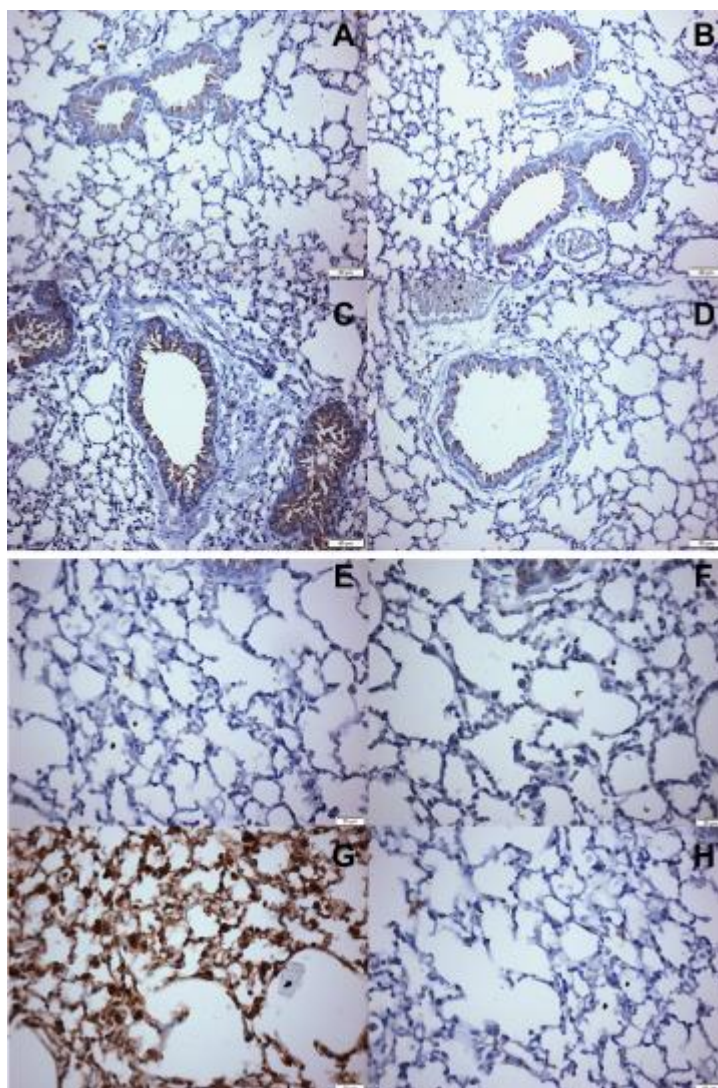
\*\*\* $p < 0,001$

**Figura 22-** Efeitos do TFA sobre o alargamento alveolar. O alargamento alveolar quando analisado mostrou-se aumentada no grupo DPOC, quando comparada aos demais, comprovando a efetividade do modelo experimental adotado (\*\*p<0,001). Em contrapartida, o grupo DPOC+Exercício apresentou positivamente a diminuição deste alargamento alveolar em relação ao grupo DPOC somente sensibilizado (\*\*p<0,001).



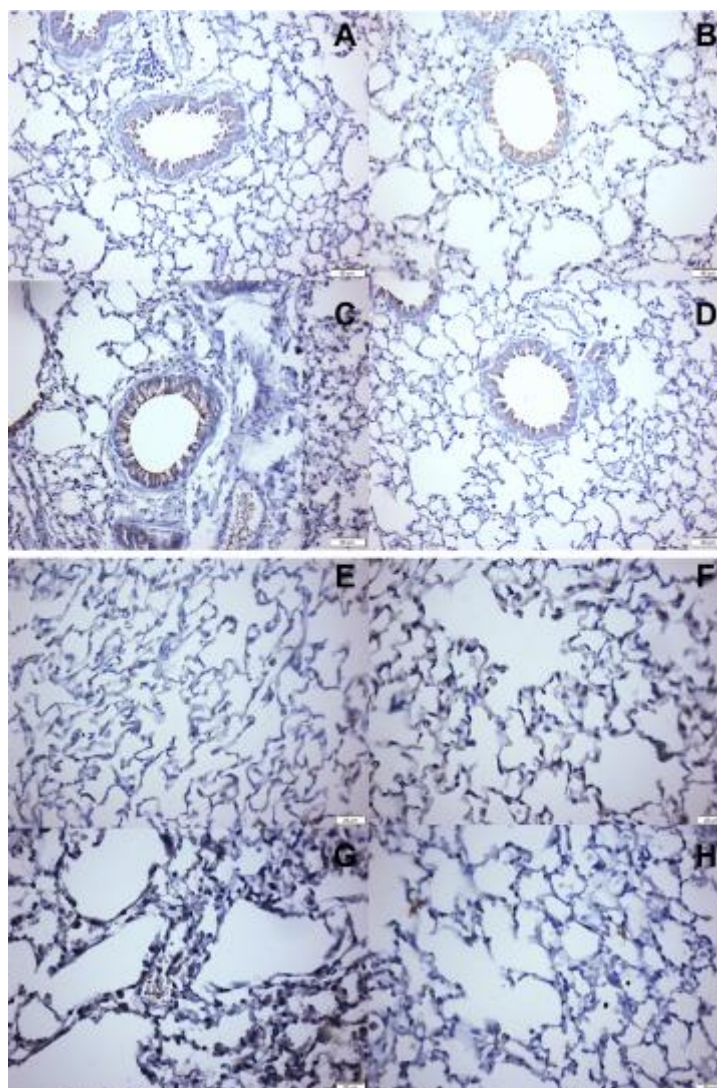
\*\*p<0,001

**Figura 23 – Fotomicrografias representativas da expressão de STAT-3.** As fotomicrografias A-D representam a expressão de STAT3 pelo epitélio brônquico e pelos leucócitos peribrônquicos e as fotomicrografias E-H representam a expressão de STAT3 pelos leucócitos no parênquima.



As fotomicrografias A e E referem-se ao grupo Control, B e F ao grupo Exe, C e G ao grupo DPOC e D e H ao grupo DPOC+Exe. As fotomicrografias A-D foram obtidas num aumento de 200x e as fotomicrografias de E-H num aumento de 400x.

**Figura 24 – Fotomicrografias representativas da expressão de STAT-3 fosforilada (p-STAT3).** As fotomicrografias A-D representam a expressão de p-STAT3 pelo epitélio brônquico e pelos leucócitos peribrônquicos e as fotomicrografias de E-H pelos leucócitos no parênquima pulmonar.

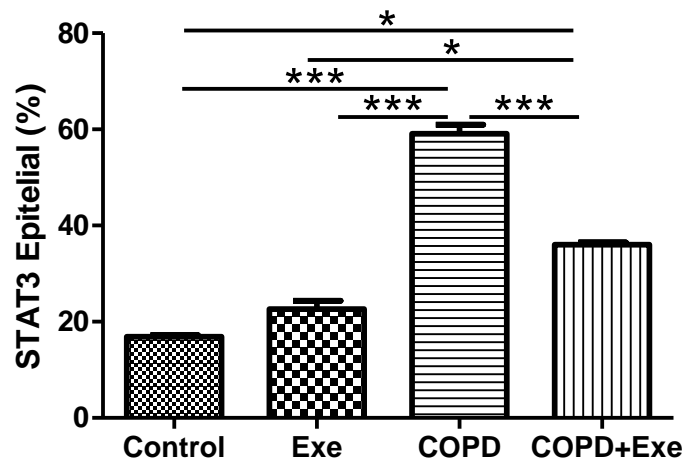


As fotomicrografias A e E referem-se ao grupo Control, B e F ao grupo Exe, C e G ao grupo DPOC e D e H ao grupo DPOC+Exe. As fotomicrografias A-D foram obtidas num aumento de 200x e as fotomicrografias de E-H num aumento de 400x.



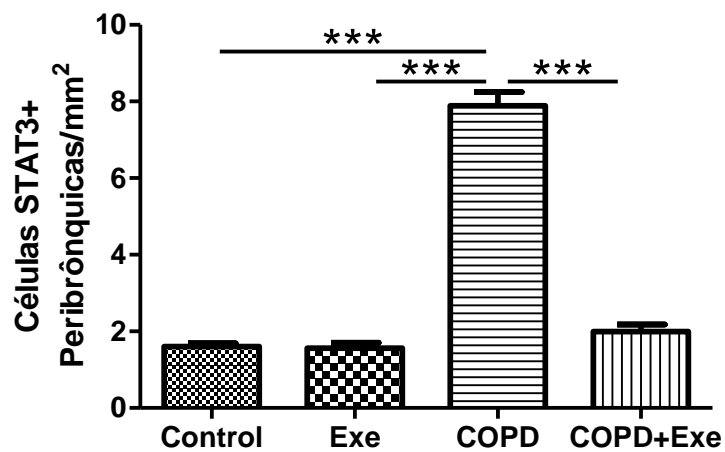
**Figura 25 – Efeitos do TFA sobre a expressão de STAT3 pelo epitélio brônquico.**

A figura 25 demonstra que o modelo experimental de DPOC utilizado levou ao aumento da expressão de STAT3 em sua forma integral pelo epitélio brônquico quando comparado a todos os demais grupos ( $p < 0.001$ ). Por outro lado, a figura 25 também demonstra que o TFA foi capaz de inibir significativamente a expressão de STAT3 pelo epitélio brônquico quando comparado ao grupo DPOC ( $p < 0.001$ ). Entretanto, o TFA no grupo DPOC não foi capaz de inibir aos níveis basais, a expressão de STAT3, permanecendo mais elevada em relação aos grupos Control e Exe ( $p < 0.05$ ).



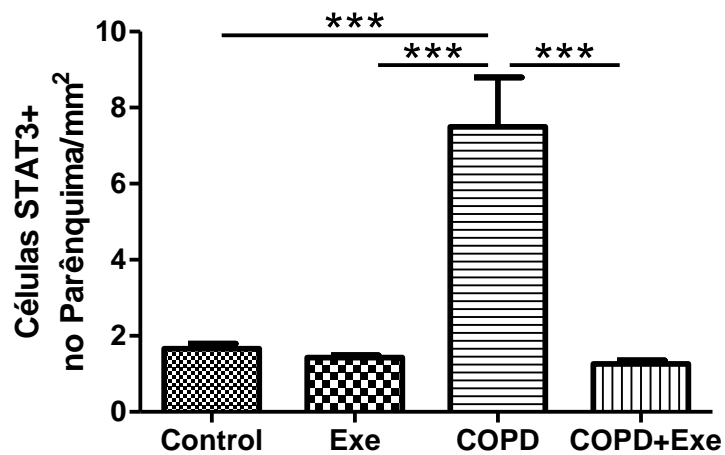
\*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ .

**Figura 26 – Efeitos do TFA sobre a expressão de STAT3 pelos leucócitos peribrônquicos.** A figura 26 demonstra que o modelo experimental de DPOC utilizado levou ao aumento da expressão de STAT3 em sua forma integral pelos leucócitos peribrônquicos quando comparado a todos os demais grupos ( $p < 0.001$ ). Por outro lado, a figura 26 também demonstra que o TFA foi capaz de inibir significativamente a expressão de STAT3 pelos leucócitos peribrônquicos quando comparado ao grupo DPOC ( $p < 0.001$ ).



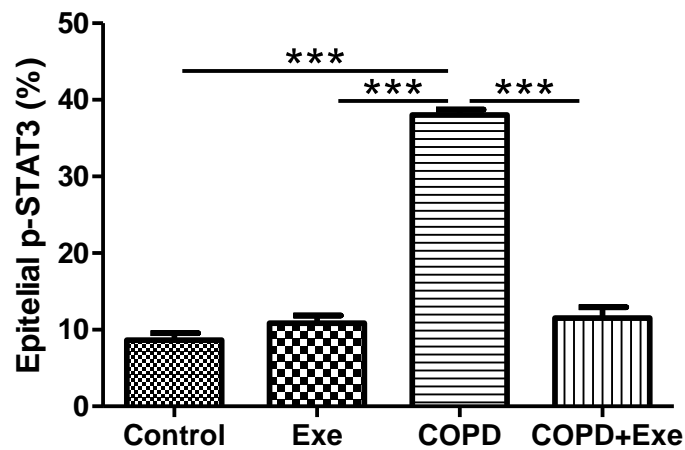
\*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ .

**Figura 27 – Efeitos do TFA sobre a expressão de STAT3 pelos leucócitos no parênquima.** A figura 27 demonstra que o modelo experimental de DPOC utilizado levou ao aumento da expressão de STAT3 em sua forma integral pelos leucócitos no parênquima quando comparado a todos os demais grupos ( $p < 0.001$ ). Por outro lado, a figura 27 também demonstra que o TFA foi capaz de inibir significativamente a expressão de STAT3 pelos leucócitos no parênquima quando comparado ao grupo DPOC ( $p < 0.001$ ).



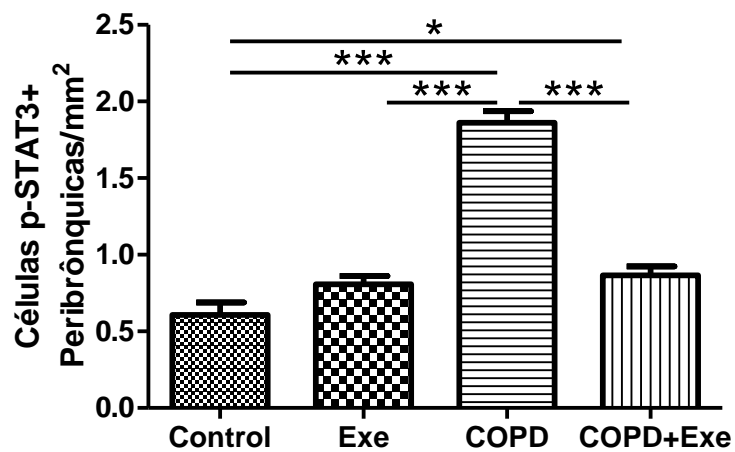
\*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ .

**Figura 28 – Efeitos do TFA sobre a expressão de p-STAT3 pelo epitélio brônquico.** A figura 28 demonstra que o modelo experimental de DPOC utilizado levou ao aumento da expressão de STAT3 fosforilada (p-STAT3) pelo epitélio brônquico quando comparado a todos os demais grupos ( $p < 0.001$ ). Por outro lado, a figura 28 também demonstra que o TFA foi capaz de inibir significativamente a expressão de p-STAT3 pelo epitélio brônquico quando comparado ao grupo DPOC ( $p < 0.001$ ).



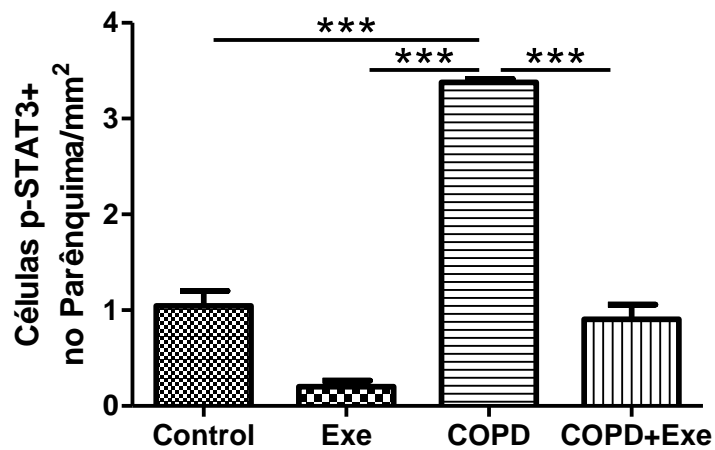
\*\*\* $p < 0.001$ .

**Figura 29 – Efeitos do TFA sobre a expressão de p-STAT3 pelos leucócitos peribrônquicos.** A figura 29 demonstra que o modelo experimental de DPOC utilizado levou ao aumento da expressão de STAT3 fosforilada pelos leucócitos peribrônquicos comparado a todos os demais grupos ( $p < 0.001$ ). Por outro lado, a figura 29 também demonstra que o TFA foi capaz de inibir significativamente a expressão de STAT3 fosforilada pelos leucócitos peribrônquicos quando comparado ao grupo DPOC ( $p < 0.001$ ). Entretanto, o TFA no grupo DPOC não foi capaz de inibir aos níveis basais, a expressão de STAT3 fosforilada pelos leucócitos peribrônquicos, permanecendo mais elevada em relação ao grupo Control ( $p < 0.05$ ).



\*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ .

**Figura 30 – Efeitos do TFA sobre a expressão de p-STAT3 pelos leucócitos no parênquima.** A figura 30 demonstra que o modelo experimental de DPOC utilizado levou ao aumento da expressão de p-STAT3 pelos leucócitos no parênquima quando comparado a todos os demais grupos ( $p < 0.001$ ). Por outro lado, a figura 30 também demonstra que o TFA foi capaz de inibir significativamente a expressão de p-STAT3 pelos leucócitos no parênquima quando comparado ao grupo DPOC ( $p < 0.001$ ).



\*\*\* $p < 0.001$ .

## **5. Discussão**

Neste estudo foi demonstrado que o TFA de intensidade leve inibiu os parâmetros inflamatórios investigados, como a celularidade total presente no LBA, além do número de neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Também foi reduzida a presença de citocinas pró-inflamatórias no LBA e no soro. O estudo também demonstrou que o TFA de intensidade leve foi capaz de inibir o remodelamento brônquico induzido pela inflamação pulmonar crônica. Esses resultados sugerem que o treinamento físico aeróbio pode exercer um importante papel no tratamento da DPOC, devido aos seus possíveis efeitos anti-inflamatórios em relação à doença.

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma enfermidade respiratória predominantemente inflamatória que leva a infiltração de células inflamatórias, o dano epitelial das vias aéreas, a remodelação e a fibrose pulmonar sendo características centrais de desordens inflamatórias do pulmão.

Os resultados apresentados neste estudo apontaram alta prevalência de células inflamatórias no LBA e no espaço peribrônquico ( neutrófilos, macrófagos e linfócitos) nos grupos DPOC e também induziu o acúmulo de fibras de colágeno nas vias aéreas . Tal aumento pode ser justificado através da presença de citocinas como a IL-1 beta, IL-6, CXCL-1 e TN-alfa, dentre outras, mediando a presença destas células, corroborando com achados anteriores.

O modelo de inflamação pulmonar adotado neste estudo mostrou-se efetivo no que se diz a respeito de mostrar os achados na fisiopatologia do DPOC. Adicionalmente, o modelo de DPOC também aumentou a expressão de STAT3 fosforilada, pelos leucócitos peribrônquicos.

No presente estudo, a partir do modelo experimental utilizado, os grupos DPOC apresentaram também leucócito no parênquima e pelo epitélio brônquico como já demonstrado em estudos anteriores. (Vieira, 2014).

A STAT3 é o tema de intensa investigação científica, porque é conhecida por ser um fator importante de transcrição que liga os genes necessários para a divisão, o crescimento e a morte celular. Nesse estudo mostrou que Stat3 é ativado no pulmão após a lesão pulmonar aguda, e parece servir como um agente intermediário para citocinas anti-inflamatórias durante a lesão pulmonar.

Estudos anteriores relacionam os efeitos da ativação epitelial brônquica da proteína STAT3 junto à transcrição de citocinas, tais como IL-1 e IL-06. Tais achados vão de encontro aos resultados deste presente estudo, uma vez que o grupo submetido a fumaça de cigarro DPOC apresentou alta prevalência desta proteína no epitélio das vias aéreas bem como no espaço peribrônquico. Adicionalmente, também foram encontrados em altos níveis as citocinas CXCL-1 e TN-alfa no LBA.

Se por um lado o modelo adotado com DPOC se apresentou como um eficiente modelo de inflamação pulmonar, aumentando os principais parâmetros inflamatórios abordados, por outro o TFA foi capaz de atenuá-los.

O grupo submetido ao TFA concomitante à ação da fumaça de cigarro, apresentou ao final do protocolo a redução do número total de células no LBA, importante característica do DPOC, uma vez que estudos anteriores sugerem (Almeida,A.R,2015) que o treinamento físico aeróbio pode ter papel na redução da inflamação pulmonar, embora os mecanismos pelos quais isto ocorra ainda não estejam totalmente compreendidos.

O treinamento físico aeróbio (TFA) realizado de maneira adequada apresenta efeitos anti-inflamatórios para as vias aéreas em modelos experimentais de DPOC.



No entanto, até o momento nenhum trabalho avaliou alguma possível via celular e molecular envolvida nos efeitos do TFA na DPOC. Contudo, neste estudo foi apresentada a redução de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, também diminuiu o acúmulo de fibras de colágeno nas vias aéreas do grupo DPOC+EXERC. Adicionalmente, o TFA reduziu-se os níveis de IL1-beta, IL-6, CXCL-1 e TNF-alfa, que no modelo experimental de DPOC apresentou-se muito elevada.

Os efeitos benéficos do treinamento físico aeróbio têm sido amplamente estudados por autores como, Almeida, A.R. (2015). No entanto, a co-relação da atividade física com a via de sinalização STAT3 ainda carece de investigações que elucidem o seu papel.

Gao e Ward, 2014 descobriram que proteína STAT3 produzido nos pulmões de modelos experimentais de DPOC e , foram induzidos por complexos imunes de IgG. Também foi verificado que a ativação STAT3 dependia da presença de macrófagos, neutrófilos, e citocinas, interleucina-6 e interleucina-10. Descobriram também a presença de uma proteína chamada SOCS3, que suprime a citocina de sinalização, e uma proteína chamada C5a que parece desencadear a produção de proteínas reguladoras.

O que temos aqui é um sistema que regula a resposta inflamatória e previne a excessiva ativação de todo o sistema, diz Ward et.al., 2014 Se você bloquear qualquer um dos produtos neste caminho, a capacidade de regular a resposta inflamatória está perdida. Em essência, isso significa que não há fim à intensidade da resposta, e torna-se extremamente prejudicial para o tecido pulmonar. (Ward, et.al., 2014)

A respeito da via JAK/STAT abordando especificamente STAT3, Fernandes et al. (2015) demonstraram que o treinamento físico aeróbio é capaz de regular a expressão desta proteína.

Adicionalmente, autores como Bevisi et al. (2016) abordam em seus estudos a relação da proteína STAT3 e a citocina IL-6 dizendo que isto é particularmente interessante como mostrado num estudo recente de associação do genoma de uma coorte norueguesa, mostrando que um polimorfismo no gene de STAT3 pode conferir susceptibilidade de desenvolver DPOC. De igual modo, eles foram capazes de mostrar aumento da fosforilação da STAT3 por transferência de Western em pacientes com DPOC em comparação com não fumantes. Este resultado é consistente com níveis elevados de interleucina IL -6 que são vistos no LBA e no tecido pulmonar de pacientes com DPOC (Belvisi, 2016) e ao fato de que a IL-6 é reconhecida para ativar STAT3 . Além disso, outras citocinas, tais como o TNF-alfa, IL-2, IL-12, IL-17 e IL-22, pode tanto estimular a via de sinalização de JAK-STAT ou ser expressa como uma consequência da ativação desta via.( Belvisi, 2016).

A produção destas citocinas é susceptível de ser envolvido na inflamação crônica observada em células de modelos de DPOC e a subsequente estrutura pulmonar e função alterada. (Belvisi, 2016). Estes dados sugerem por esses mesmos autores que, a via JAK-STAT está envolvida na fisiopatologia da DPOC e necessitam de maiores investigações.

Até o presente momento, não foram realizados estudos abordando o papel da STAT3 em relação ao treinamento físico, seja ele aeróbio ou resistido. Sendo assim, o presente trabalho especula que o TFA possa ter sido responsável pela diminuição da STAT3 no grupo DPOC+Exercício em relação ao DPOC uma vez que é de conhecimento que esta proteína modula os níveis de IL1, IL-6, TNF-alfa e este marcador encontrou-se igualmente diminuído no grupo DPOC e treinado.

Acerca dos efeitos do TFA no número de colágeno na via aérea, notou-se a diminuição do grupo DPOC e concomitantemente treinado. Contrariamente, tal índice

se apresentou elevado no grupo somente DPOC, indo de encontro com achado prévios de Vieira et al.(2012).

Este trabalho contou com um eficiente modelo de inflamação pulmonar DPOC, que pode em muitos parâmetros mimetizar as características da doença.(Vieira,2011) Os resultados apresentados neste trabalho se mostraram favoráveis à prática do treinamento físico aeróbio em intensidade leve, com as ressalvas e precauções ao serem transpostos para a prática clínica, visando todos os benefícios já explorados como o seu caráter antiinflamatório, melhora da ventilação minuto, além do aumento dos parâmetros que tangem a qualidade de vida do paciente.

## **6. Considerações finais**

Os resultados do presente estudo sugerem que a atividade física aeróbia de intensidade leve reduz a inflamação, o número de colágeno nas vias aéreas, e a sinalização da proteína STAT3 dentro modelo experimental de inflamação pulmonar induzida pela fumaça de cigarro. Estes efeitos sugerem estar sendo mediados pela redução da resposta imune da via de sinalização JAK-STAT.

No entanto, a literatura ainda carece de mais estudos que embasem a via JAK-STAT e principalmente a STAT3 que parece estar mais envolvida com a sinalização da DPOC. Assim sendo, os efeitos anti-inflamatórios promovidos pelo treinamento físico aeróbio de intensidade leve necessitam de maior aprofundamento em seus estudos.

## 7. Referências

Abbas, a. K.; Lichtman, a. H.; Pillai, s. H. I. V. *Imunologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

Almeida-Oliveira, A. R. ; Aquino Junior, J. C. J. ; Oliveira-Junior, M. C. ; Sousa, A. S. A. ; Assumpcao Neto, E. ; Britto, A. ; Rigonato-Oliveira, N. C. ; Moraes, G. ; Oliveira, A. P. L. ; **Vieira, R. P.** . Aerobic Exercise Reduces Asthma Phenotype Through Inhibition Of Socs-Jak-Stat Signaling In Airway Epithelium. In: European Respiratory Congress, 2015, Amsterdam. *European Respiratory Journal*, 2015. V. 46. P. 2211.

An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Key concepts and advances in pulmonary rehabilitation. 2013.

Andrea Zanini, Alfredo Chetta , Andrea S Imperatori , Antonio Spanevello, Dario Olivieri. The role of the bronchial microvasculature in the airway remodelling in asthma and COPD. *Respiratory Research* 2010, 11:132.

Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Invest* 2008; 118:3546–3556.

Bennett RG. Relaxin and its role in the development and treatment of fibrosis. *Transl Res.* 2009 Jul;154(1):1-6. doi: 10.1016/j.trsl.2009.03.007. Epub 2009 Apr 22. Review.

Campbell DJ, Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2007;7(4):305-10.

Chen KC, Hsieh CL, Peng CC, Peng RY. Exercise rescued chronic kidney disease by attenuating cardiac hypertrophy through the cardiotrophin-1 -> LIFR/gp 130 -> JAK/STAT3 pathway. *Eur J Prev Cardiol.* 2014 Apr;21(4):507-20.

Cleiton Augusto Libardi Et Al. Comparação de Testes de 1RM e 10RMs em Homens  
Costa CH et al. Células inflamatórias e seus mediadores na patogênese da DPOC;  
*Rev Assoc Med Bras* 2009; 55(3): 347-54

Dawkins PA, Stockley RA. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2001; 56 (12): 972-7.

Dudley AC, Thomas D, Best J, Jenkins A. A VEGF/JAK2/STAT5 axis may partially mediate endothelial cell tolerance to hypoxia. *Biochemical Journal*. 2005;390(Pt 2):427-436.

Dürk T, Duerschmied D, Müller T, Grimm M, Reuter S, Paula Vieira R, 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.

Gannam S, Abe JM, Esteves PB, Freitas FM, Wakassa TB et al. Emprego da determinação de monóxido de carbono no ar exalado para a detecção do consumo de tabaco. *J Pneumol*. 2001 Set-Out; 27(5): 231-36.

Garcia-Aymerich, J., Lange, P., Benet, M., Schnohr, P., Anto, J.M. 2007. Regular physical activity modifies smoking-related lung function decline and reduces risk of chronic obstructive pulmonary disease: a population-based cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* 1;175(5):458-63.

GOLD - Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. National Heart, Lung and Blood Institutes. Updated 2003. [www.goldcopd.com](http://www.goldcopd.com).

Guyton, A.C., Hall, J.E., *Tratado de Fisiologia Médica*. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. PAS - Pesquisa Anual de Serviços, 2012. [online] Disponível na internet via URL: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/tabuadevida/2012>.

Idzko M, Ayata CK, Müller T, Dürk T, Grimm M, Baudi K, Vieira RP, Cicko S, Boehlke C, Zech A, Sorichter S, Pelletier J, Sévigny J, Robson SC. Attenuated allergic airway inflammation in CD39 null mice. *Allergy*. 2013;68:472-480.

Jin Y, Wan Y, Chen G, Chen L, Zhang M-Q, et al. Treg/IL-17 Ratio and Treg Differentiation in Patients with COPD; October 2014 | Volume 9 | Issue 10 | e111044

Jornal Brasileiro de Pneumologia- II Consenso Brasileiro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.“Caracterização da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) – Definição, Epidemiologia, Diagnóstico e Estadiamento”. 2004

Klover P, Hennighausen L. Postnatal body growth is dependent on the transcription factors signal transducers and activators of transcription 5a/b in muscle: a role for autocrine/paracrine insulin-like growth factor I. *Endocrinology*. 2007 Apr;148(4):1489-97. Epub 2006 Dec 7.

Li XF, Liao J, Xin ZQ, Lu WQ, Liu AL. Relaxin attenuates silica-induced pulmonary fibrosis by regulating collagen type I and MMP-2. *Int Immunopharmacol*. 2013 Nov;17(3):537-42. doi: 10.1016/j.intimp.2013.07.020. Epub 2013 Aug 20.

Miot H. A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. *Jornal Vasc Bras* , Vol. 10, Nº 4 2011.

Moreira GL, Pitta F, Ramos D, Nascimento CSC, Barzon D, Kovelis D et al. *J Bras Pneumol*. 35(8):737-744 Versão em português do Chronic Respiratory Questionnaire: estudo da validade e reprodutibilidade. 2009.

Muller T, Vieira RP, Grimm M, Durk T, Cicko S, Zeiser R, Jakob T, Martin SF, Blumenthal B, Sorichter S, Ferrari D, Di Virgillio F, Idzko M. A potential role for P2x7R in allergic airways inflammation in mice and humans. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 44(4):456-64 (2011).

Nascimento, E. S. P. , Gomes, E. L. F. D. , Souza, F. S. P. ,Dias, F. ; Sampaio, L. M. M., Greiffo, F. R. ,Oliveira, A. P. L., Stirbulov, R. ; Vieira, R. P. ; Costa, D. Home-based

pulmonary rehabilitation improves clinical features and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease patients. *International Journal of COPD* **JCR**, v. 10, p. 645-653, 2015.

Pelaia G, Vatrella A, Busceti MT, Gallelli L, Calabrese C, Terracciano R, Maselli R. Cellular Mechanisms Underlying Eosinophilic and Neutrophilic Airway Inflammation in Asthma. *Mediators Inflamm* 2015;2015:879783.

Pneumo Atual Perguntas e respostas em Reabilitação pulmonar; *Medicina Atual Pediátrica Ginecologia Oncologia* ISSN 1519521X Volume 15 N° 2.

Royce SG, Moodley Y, Samuel CS. Novel therapeutic strategies for lung disorders associated with airway remodelling and fibrosis. *Pharmacol Ther.* 2014 Mar;141(3):250-60. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.10.008. Epub 2013 Oct 25.

Sampath, D., M. Castro, D. C. Look, and M. J. Holtzman. 1999. Constitutive activation of an epithelial signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway in asthma. *J. Clin. Invest.* 103: 1353–1361

Schuijs MJ, Willart MA, Hammad H, Lambrecht BN. Cytokine targets in airway inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 2013;13(3):351-61

Schumann, R. R., C. J. Kirschning, A. Unbehauen, H. P. Aberle, H. P. Knope, N. Lamping, R. J. Ulevitch, and F. Herrmann. 1996. The lipopolysaccharide binding protein is a secretory class 1 acute-phase protein whose gene is transcriptionally activated by APRF/STAT/3 and other cytokine-inducible nuclear proteins. *Mol. Cell. Biol.* 16: 3490–3503 September 1999, Volume 55, [Issue 12](#), pp 1523-1534.

Shimoda, K., J. van Deursen, M. Y. Sangster, S. R. Sarawar, R. T. Carson, R. A. Tripp, C. Chu, F. W. Quelle, T. Nosaka, D. A. Vignali, et al.. 1996. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 380: 630–633.



Silva RA, Vieira RP, Duarte AC, Lopes FD, Perini A, Mauad T, Martins MA, Carvalho CR. Aerobic training reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. *Eur Respir J*. 2010 May;35(5):994-1002.

Spangenburg EE, Brown DA, Johnson MS, Moore RL. Exercise increases SOCS-3 expression in rat skeletal muscle: potential relationship to IL-6 expression. *J Physiol*. 2006 May 1;572(Pt 3):839-48.

T. C. Yeh, S. Pellegrini. The Janus kinase family of protein tyrosine kinases and their role in signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*.

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.

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 39:254-264.

Vieira RP, Duarte AC, Santos AB, Medeiros MC, Mauad T, Martins MA, Carvalho CR, Dolhnikoff M. Exercise reduces effects of creatine on lung. *Int J Sports Med*. 2009 Sep;30(9):684-90.

Vieira RP, Muller T, Grimm M, Von Gernler V, Vetter B, Durk T, Cicko S, Ayata CK, Sorichter S, Robaye B, Zeiser R, Ferrari D, Kirschbaum A, Zissel G, Virchow JC, Boeynaems JM, Idzko M. Purinergic receptor type 6 contributes to airway inflammation and remodeling in experimental allergic airway inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 184(2):215-23 (2011).

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):383-389.

Vieira RP. Papel da sinalização purinérgica e da sinalização SOCS-JAK-STAT nos efeitos antiinflamatórios do treinamento aeróbio em modelos experimentais de asma e em indivíduos asmáticos. 2012.

Wehrmeister FC, Knorst M, Jardim JR, Macedo SEC, Noal RB, Martínez-Mesa J et al; Programas de reabilitação pulmonar em pacientes com DPOC; J Bras Pneumol. 2011;37(4):544-555

Wright, J. L., and Churg, A. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *Am Rev Respir Dis* 142, 1422-8, (1990).

Xia WH, Li J, Su C, Yang Z, Chen L, Wu F, Zhang YY, Yu BB, Qiu YX, Wang SM, Tao J. Physical exercise attenuates age-associated reduction in endothelium-reparative capacity of endothelial progenitor cells by increasing CXCR4/JAK-2 signaling in healthy men. *Aging Cell*. 2012 Feb;11(1):111-9.

Yaspelkis BB 3rd, Kvasha IA, Lessard SJ, Rivas DA, Hawley JA. Aerobic training reverses high-fat diet-induced pro-inflammatory signalling in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. 2010 Nov;110(4):779-88.

Ye F1, Chen HZ, Xie X, Ye DF, Lu WG, Ding ZM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and ovarian carcinoma cell supernatant activate signal transducers and activators of transcription (STATs) via VEGF receptor-2 (KDR) in human hemopoietic progenitor cells. *Gynecol Oncol*. 2004 Jul;94(1):125-33.

## 8. Anexo

### 8.1 Anexo I – Aprovação do comitê de ética




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 **001/14** intitulado: “Efeitos do exercício físico aeróbio regular sobre a lesão pulmonar induzida por exposição à fumaça de cigarro em um modelo experimental de Síndrome Metabólica” que utilizará **130** animais da espécie **Camundongo**, 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: Prof. Dr. Chin Jia Lin**

**Pesquisador (a) Executante: Camila Liyoko Suehiro**

**CEP-FMUSP, 20 de Fevereiro de 2014.**



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



**Prof. Dr. Roger Chammas**  
**Coordenador**  
**Comitê de Ética em Pesquisa**