UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Efeitos do treinamento aeróbio sobre a morfologia e função barreira da mucosa intestinal em ratos Wistar

ALINE VASQUES DA COSTA

SÃO PAULO
2017

ALINE VASQUES DA COSTA

Efeitos do treinamento aeróbio sobre a morfologia e função barreira da mucosa intestinal em ratos Wistar

Área de Concentração: Estudos Biodinâmicos da Educação Física e Esporte

Dissertação apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre em ciências

Orientador: Prof. Dr. Antonio Herbert Lancha Junior

SÃO PAULO
2017

Nome: COSTA, Aline Vasques

Título: Efeitos do treinamento aeróbio sobre a morfologia e função barreira da mucosa intestinal em ratos Wistar

Dissertação apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus dois filhos Arthur e Thales que me proporcionaram a excepcional experiência do amor incondicional e da infinita realização de ser mãe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que guia meus passos e me faz ter fé para acreditar sempre no hoje e no amanhã.

Aos meus pais que me deram a vida e sem eles nada seria realizado.

À minha Tia Sandra pelo amor infinito, por todo incentivo em todas as minhas etapas da vida, por toda sua perseverança e por acreditar sempre em mim.

À toda minha família que me apoia: Minha irmã Déia, meu tio Zé, minha madrinha Carla, tio Beto, além das minhas sobrinhas e sobrinhos netos: Nathalia, Vithoria, Manuella e Renzo. Vocês são minha base.

À minha amiga de infância Geruza por todas as conversas, aprendizados e sonhos que partilhamos ao longo dessa amizade e ao seu marido Marcelo que chegou em um momento muito especial e também pôde contribuir para minha evolução acadêmica com seus ensinamentos mesmo que a distância.

Ao meu orientador Prof. Lancha Junior por acreditar no meu trabalho e me proporcionar essa experiência de desenvolver uma pesquisa científica. Com certeza contribuiu bastante para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Às professoras Edilamar Menezes e Patricia Gama pelo exemplo de profissionalismo e liderança. Por toda ajuda nos momentos que eu mais precisei de apoio e por todas as conversas científicas ou não dedicadas a mim.

Ao meu querido amigo “jovem” Will que esteve ao meu lado desde o dia que entrei no laboratório. Por toda sua ajuda com os experimentos, “puxões de orelha”, por cada conversa e cada gráfico que era discutido e sempre com um sorriso no rosto. Agradeço também por me mostrar o caminho certo de amar a Deus.

A todos meus amigos do laboratório de nutrição e outros labs que pude ter o privilégio de compartilhar momentos incríveis de alegrias que passamos juntos: Alan, Vitão, Igor, Rafa Pires, Bryan (por também corrigir meus textos em inglês), Livia, Mari Captani, Aline Tritto, Gui Yamaguchi, Kleiner, Clara, Rapha (carioca), Fernanda Macuco, Geovana, Keth, Isadora, Melissa e em especial a Ayane por toda sua generosidade, carisma e dedicação.

Agradecimento especial a Noemy e Thiago Fernandes pela prontidão, pelas conversas sempre divertidas e pela ajuda nas análises finais do meu trabalho.

Aos técnicos de dentro e fora do lab nutri que me ajudaram tanto com trabalho como também com o conhecimento de uma nova técnica que eu aprendia no dia a dia dos experimentos: Júnior, Ney, Glória, Úrsula e Vitinho.

À Secretaria de Pós-Graduação e ao Departamento de Educação Física e Esporte da USP, em especial ao Márcio, Ilza, Shirley, Cris e Claudia por todo suporte necessário ao longo dos anos.

À CAPES pelo apoio financeiro e incentivo a pesquisa.

Se fiz descobertas valiosas, foi mais por ter paciência do que qualquer outro talento.

Isaac Newton

RESUMO

Costa, A.V. **Efeitos do treinamento aeróbio sobre a morfologia e função barreira da mucosa intestinal em ratos Wistar. 2017.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2017.

O treinamento aeróbio de forma crônica está correlacionado com menor grau de inflamação e pode ser considerado um dos principais responsáveis por criar condições favoráveis para o equilíbrio intestinal. A mucosa do intestino consiste em uma monocamada de células epiteliais com função principal de absorção de nutrientes e formação de barreira contra entrada de potenciais antígenos que podem prejudicar sua função. A permeabilidade da barreira intestinal pode ser controlada por diferentes processos. Um aumento de antígenos luminais como lipopolissacarídeo (LPS) pode gerar um aumento na permeabilidade paracelular através de quebra das principais proteínas de função barreira, claudina e ocludina, ativando o sistema imune local, levando a um processo de inflamação e dano do tecido. Essas alterações da função barreira estão ligadas com algumas doenças como a doença inflamatória intestinal e o câncer. Por essa razão, faz-se necessário entender o papel do exercício físico na regulação da integridade da mucosa intestinal e seu efeito terapêutico. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito do treinamento aeróbio sobre a morfologia e função barreira da mucosa intestinal em ratos wistar. Na primeira etapa, os animais foram divididos em 2 grupos: grupo 1 – controle sedentário (CTRL), grupo 2 – treinado (T) e desenvolvido um treinamento aeróbio durante 8 semanas com uma carga correspondente a 65% da velocidade máxima atingida no teste de exercício físico progressivo até a exaustão, por 60 minutos durante 5 vezes por semana.

O treinamento físico promoveu uma maior perda de peso nos animais treinados sem aumento do consumo de ração comparado com animais sedentários.

A segunda etapa ocorreu após o período de treinamento para um tratamento com 3 dias de injeção de LPS intraperitoneal. Os animais foram divididos em 4 subgrupos: grupo 1 – controle sedentário (CTRL), grupo 2 – treinado (T), grupo 3 – controle sedentário com LPS (CTRL + LPS) e grupo 4 – treinado com LPS (treinado + LPS). Os animais sedentários com LPS apresentaram uma maior perda de peso e menor consumo de ração além de maior perda de altura das vilosidades intestinais em detrimento ao maior grau de inflamação com aumento também de infiltrados no cólon. Em contrapartida, o treinamento físico apresentou um efeito protetor sobre a perda de peso e as vilosidades intestinais observados nos animais treinados com LPS. Além disso, foi analisado a expressão gênica de algumas interleucinas pró e anti-inflamatórias (IL 1β, IL 6, IL 10 e IL 23) e os genes para claudina 1 e ocludina. O principal aumento foi observado no perfil gênico da IL23 uma citocina pró inflamatória e da claudina 1 nos animais sedentários com LPS em comparação ao controle como uma ação compensatória para reparação da permeabilidade intestinal e função barreira. Juntos, esses resultados apoiam a hipótese de que o treinamento físico é um fator importante para proteção da integridade da mucosa e função barreira intestinal.

Palavras-chave: mucosa intestinal, função barreira, treinamento aeróbio.

ABSTRACT

Costa, A.V. **Effect of aerobic training on morphology and barrier function of the intestinal mucosa in rats.** Masters Thesis. School of Physical Education and Sports, University of São Paulo, São Paulo; 2017.

Chronic aerobic training correlates with low level of inflammation and is considered one of the main factors in creating favorable conditions for intestinal balance. The intestinal mucosa consists of a monolayer of epithelial cells whose the main function is to absorb nutrients and form a barrier against entry of potential antigens that may impair its function. Different processes control the permeability of the intestinal barrier. An increase in luminal antigens such as lipopolysaccharides (LPS) may lead to an increase in paracellular permeability through the breakdown of the main barrier proteins, claudin and occludin, activating the local immune system, leading to a process of inflammation and tissue damage. These changes in barrier function are linked to some pathologies including inflammatory bowel disease and cancer. For this reason, it is necessary to understand the role of physical exercise in regulating the integrity of the intestinal mucosa and its therapeutic effect. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of aerobic training on the morphology and barrier function of the intestinal mucosa in wistar rats. For the first stage of this project, animals were separated into 2 groups: group 1 - sedentary control (CTRL), group 2 - trained (T) which involved 8 weeks of aerobic training, five sessions of one hour, with a load corresponding to 65% of the maximum speed attained in a progressive exercise test to exhaustion. Physical training promoted weight loss in trained animals without increased

feed intake compared to sedentary animals.

The second stage of this project was performed after the training period and involved 3 days of intraperitoneal LPS injections. The animals were separated into 4 subgroups: group 1 - sedentary control (CTRL), group 2 - trained (T), group 3 - sedentary control with LPS (CTRL + LPS) and group 4 - trained with LPS (trained + LPS). Sedentary LPS animals presented greater weight loss and lower feed intake, as well as greater height loss of intestinal villi, a higher degree of inflammation and also increased colon infiltrates. In contrast, physical training had a protective effect on weight loss and intestinal villi in animals who trained and received LPS. In addition, gene expression of some pro and anti-inflammatory interleukins (IL-1β, IL-6, IL-10 and IL-23) and the genes for claudin 1 and occludin were analyzed. The main increase was shown in the gene profile of IL23 a proinflammatory cytokine and claudin 1 in sedentary with LPS animals as a compensatory action for repair of intestinal permeability and barrier function.

Together, these results support the hypothesis that physical training is an important factor for protection of mucosal integrity and intestinal barrier function. Keywords: intestinal mucosa, barrier function and aerobic training.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diferenciação das células T CD4+ induzidas por bactérias comensais.....24

Figura 2 –. Desenho experimental.....34

Figura 3 - Efeito do treinamento físico sobre os parâmetros fisiológicos.....43

Figura 4 – Parâmetros fisiológicos e morfológicos após desafio com LPS 46

Figura 5 - Análise histoquímica do cólon distal corada com H&E.....48

Figura 6 - Expressão gênica de interleucinas e genes relacionados à função barreira.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de primers e iniciador utilizados para realização de RT-PCR…40

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....15

2.0 REVISÃO DE LITERATURA.....17

2.1. Morfologia intestinal.....17

2.2. Permeabilidade e função barreira intestinal.....19

2.3. Lipopolissacarídeo (LPS) e sistema imune.....21

2.4. Relação entre exercício físico e mucosa intestinal.....27

3.0 JUSTIFICATIVA.....30

4.0 OBJETIVO.....31

4.1. Objetivo geral.....31

4.2. Objetivo específico.....31

5.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....32

5.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....32

5.2. Protocolo experimental.....32

5.3. Consumo de ração e massa corporal.....34

5.4. Administração de lipopolissacharideo de Escherichia Coli 35

5.5. Coleta de amostra.....35

5.6. Análise morfológica intestinal.....35

5.7. RT-PCR.....36

5.7.1. Extração de RNA.....36

5.7.2. Síntese de cDNA.....37

5.7.3. Amplificação do DNA – Reação em cadeia da polimerase (PCR)..38

5.8 Quantificação dos infiltrados do cólon.....39

6.0. ANÁLISE ESTATÍSTICA 41

7.0 RESULTADOS 41

7.1 Efeito do treinamento físico aeróbio sobre a a massa corporal e consumo de ração dos animais.....42

7.2 Efeito do treinamento físico aeróbio sobre a massa corporal e mucosa intestinal após indução da inflamação.....44

7.3 Efeito do treinamento aeróbio sobre o perfil inflamatório da mucosa do cólon.....47

7.3 Efeito do treinamento físico sobre o perfil gênico.....49

8.0 DISCUSSÃO.....51

9.0 CONCLUSÃO.....55

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....56

1.0. INTRODUÇÃO

O trato intestinal é formado por três camadas de tecido organizado. A camada mais externa é composta por tecido muscular liso em associação com o sistema nervoso e em conjunto são responsáveis pelo peristaltismo. A camada média é composta por tecido conjuntivo preenchido por fibras nervosas, vasculatura linfática e células do sistema imune e por fim, uma única camada de epitélio absortivo conhecida como mucosa (RIZK; BARKER, 2012).

A mucosa tem a função primária de digestão e absorção de nutrientes e forma uma barreira contra patógenos luminais e sustâncias tóxicas. A superfície epitelial do intestino delgado é composta por vilosidades em direção ao lúmem e invaginações conhecidas como criptas. A contínua renovação de células epiteliais ao longo do eixo cripta vilo garante a funcionalidade do intestino delgado (YANG et al., 2016). Em contrapartida, o cólon apresenta a morfologia superficial plana desprovido de vilosidades e sua principal função é absorção de água e eletrólitos, além de compactação das fezes.

Mudanças na homeostase intestinal provocadas por antígenos patogênicos como lipopolissacarídeo (LPS) de Escherichia coli, provoca perda das principais proteínas transmembrana de função barreira, tais como claudinas e ocludina, levando ao aumento da permeabilidade intestinal e ativação do sistema imunológico mediados por citocinas pró inflamatórias (O'SULLIVAN et al., 2015; YUE et al., 2012).

Entretanto, nas últimas décadas, estudos envolvendo exercício físico e função gastrointestinal vem crescendo haja vista as evidências do efeito protetor do exercício

aeróbio moderado reduzindo riscos de doenças inflamatórias intestinais, colelitíase, constipação, além do câncer de cólon. (BEHAVIOR; XIANG, 2013).

Durante o treinamento físico o volume esplâncnico é diminuído, o fluxo sanguíneo é redistribuído para os tecidos com maior necessidade de acordo com o grau de intensidade do treino. Evidências mostram que níveis extenuantes de exercício aeróbio ou de resistência podem causar hipoperfusão intestinal, diarreias e até mesmo perda da integridade da barreira. Já o treinamento físico moderado é capaz de promover baixos níveis de inflamação sistêmica e melhor redistribuição do fluxo sanguíneo, porém a influência do exercício aeróbio crônico na saúde intestinal ainda é pouco compreendida (BILSKI et al., 2013; JEUKENDRUP et al., 2000).

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morfologia Intestinal

Células do epitelio intestinal estão em contínua renovação envolvendo processos de proliferação, diferenciação, migração e apoptose ao longo do eixo cripta-vilos (YANG et al., 2016). Essa renovação se dá através de células-tronco epiteliais residentes na base das criptas com características próprias reguladas pelos nichos de células locais (CAMILLERI et al., 2012).

As células tronco dão origem a quatro tipos de células epiteliais: enterócitos com função absortiva que compõem mais de 80% das células epiteliais do intestino delgado, células caliciformes com a função de produção de mucinas e peptídeos necessários para função de crescimento epitelial e reparação da mucosa, as células enteroendócrinas capazes de exportar hormônios peptídeos e as células de paneth secretoras de defensinas antimicrobianas, enzimas digestivas e fatores de crescimento. Essas funções podem sofrer alterações fisiológicas por diferentes processos metabólicos provenientes da alimentação, estresse e/ou exercício físico. (CLATWORTHY; SUBRAMANIAN, 2001).

No entanto, em condições de inflamação da mucosa a perda das células do epitélio intestinal a partir das vilosidades excede a taxa de produção de novas células a partir das criptas, porém o mecanismo molecular envolvido nesse processo permanece incerto (WANG et al., 2016). Além disso, tal condição de perda celular pode apresentar consequências para aumento de permeabilidade intestinal, desenvolvimento de

doenças como a colite ulcerativa, doença inflamatória intestinal, doença de crohn e até mesmo encurtamento das vilosidades ou atrofia do vilo (KIESSLICH et al., 2012).

Durante o processo de perda fisiológica das células, há um rearranjo das junções de oclusão necessárias para permitir a liberação de células epiteliais intestinais e garantir a manutenção da função barreira (WILLIAMS et al., 2013).

2.2 Permeabilidade e função barreira intestinal

Entre as diversas funções do epitélio intestinal, uma das mais importantes é a função barreira, ou seja, a capacidade de controlar potenciais ações de agentes patogênicos do lúmen para o interior do ambiente intestinal. A constituição dessa função barreira está ligada às bactérias luminais, células epiteliais e o intestino associado ao tecido linfóide, nos quais trabalham em conjunto evitando essas possíveis invasões (SALZMAN; UNDERWOOD; BEVINS, 2007).

A permeabilidade intestinal é uma propriedade intrínseca do intestino, definida como a facilidade com que as moléculas atravessam o epitélio de forma passiva. O transporte de moléculas do lúmem para a lâmina própria pode ocorrer por duas vias: através de difusão paracelular de pequenas moléculas pelas junções de oclusão e o transporte transcelular através da transcitose (endocitose/exocitose) de moléculas maiores mediadas ou não por receptores de membrana (MENARD, 2010).

Fisiologicamente no lúmen há degradação de bactérias e antígenos através do ácido gástrico e suco pancreático. Além disso, bactérias comensais inibem a colonização de patógenos pela produção de substâncias antimicrobianas. A região próxima do epitélio consiste em uma camada formada de água, glicocálice e uma camada de muco contendo produtos antimicrobianos secretados por células específicas das criptas, conforme colocado anteriormente, e células secretoras de IgA (CAMILLERI et al., 2012).

A primeira linha de defesa contra a invasão de microorganismos patogênicos intestinais se dá através de secreção de mucinas a partir de células caliciformes. Os

produtos derivados destas células contribuem para regulação de uma barreira física no intestino através da regulação de proteínas que fornecem integridade estrutural ao muco e atuam como sinalizadoras para promover a reparação epitelial, migração de células do sistema imune e resistência à apoptose (PETERSON; ARTIS, 2014). Por conseguinte, a integridade da barreira intestinal é dependente das junções aderentes, desmossomos e junções de oclusão, sendo este um complexo multifuncional que forma uma vedação entre as células epiteliais adjacentes próximas a superfície apical. Elas impedem a difusão paracelular de microorganismos e outros antígenos através do epitélio (COSTELLO et al., 2009; ULLUWISHEWA et al., 2011a). Vários tipos de proteínas transmembranares foram identificados dentro das junções de oclusão com o objetivo de regular a permeabilidade paracelular de água, solutos e células do sistema imune.

A primeira proteína identificada dentro desse complexo foi a zonulina ocludens 1 (ZO-1) com propriedade de formação de poros (SHEN et al., 2015), porém duas dessas proteínas juncionais mais importantes que interagem com ZO-1 são de principal interesse deste trabalho tais como claudinas e ocludina, proteínas integrais de membrana e proteína de adesão celular respectivamente responsáveis pela regulação da permeabilidade iônica e de solutos (FANNING; MITIC; ANDERSON, 1999; GUNZEL; YU, 2013).

Funcionalmente, as claudinas são divididas em claudinas formadoras de barreira como a claudina 1 (cldn 1) e claudinas que formam poros como a claudina 2 (cldn 2). O controle da permeabilidade paracelular de íons através de claudinas formadoras de poros está bem caracterizado desempenhando um importante papel na determinação

das propriedades da permeabilidade das células epiteliais (ANGELOW; AHLSTROM; YU, 2008). Já a ocludina promove a interação do citoesqueleto ZO-1 e actomiosina e por meio de moléculas de sinalização medeia a manutenção do complexo da junção de oclusão e função barreira (ITALLIE et al., 2010). Esse mecanismo de regulação é formado a partir de regulação de cinases, fosfatases e outras moléculas sinalizadoras (YASUMATSU; TANABE, 2017).

A relação entre maturação, migração e apoptose de células epiteliais tem sido estudada para entender a manutenção da morfologia e função ao longo do eixo cripta-vilo (WILLIAMS et al., 2015). O aumento da permeabilidade intestinal causada por perda de proteínas de função barreira é considerado um importante fator patogênico para o desenvolvimento de inflamação intestinal através de aumento de fatores imunes e bacterianos (NIGHOT; HU; MA, 2015). Diversos estímulos têm demonstrado um aumento de perda de células epiteliais, dentre eles aumento de fator de necrose tumoral alfa (TNF alfa), LPS, isquemias, além de toxinas patogênicas (WILLIAMS et al., 2015).

2.3 Sistema imune e Lipopolissacarídeo (LPS)

O sistema imune intestinal é capaz de distinguir microorganismos comensais de patogênicos. Sob condições de homeostasia, o sistema imunológico é induzido pela microbiota intestinal comensal a não responder a antígenos luminais; esta microbiota secreta metabolitos a partir do processamento de nutrientes, previne contra infecções

por patógenos, proporcionando sinais para induzir o desenvolvimento imune e estimular uma resposta inata e adaptativa de forma adequada.

Alguns desses agentes patogênicos como bactérias facultativas intracelulares, resistem ao sistema de defesa inata e manipulam a imunidade adaptativa (HOOPER et al., 2001). Esse processo acontece através da adesão a borda em escova do epitélio intestinal, produzindo fatores de virulência que são secretados no meio externo ou injetado no citosol de célula hospedeira. Essa invasão leva a um remodelamento do citoesqueleto que permitem estes patógenos atravessar a barreira epitelial adentrando na célula e formando um nicho especializado que aumenta sua sobrevivência a fagocitose estabelecendo assim um processo de infecção (MANUSCRIPT, 2014; RAKOFF-NAHOUM et al., 2004).

Para controle dos processos infecciosos a partir da invasão bacteriana, células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas e macrófagos, via expressão de receptores de reconhecimento padrão (PRR), permitem determinar o tipo de resposta imune gerado contra uma variedade de antígenos intestinais. As células dendríticas possuem a capacidade de conduzir respostas as células T primárias no intestino que são gerados nos gânglios linfáticos mesentéricos intestinal e nas placas de peyer. Já na lâmina própria (LP), estas células reconhecem e respondem a produtos bacterianos do lúmen intestinal, para manutenção do equilíbrio imunogênico contra patógenos invasores e tolerogênico para microbiota comensal (MANN et al., 2015).

Algumas formas de microorganismos têm sido mostrado capazes de alterar diretamente a expressão das proteínas de junções de oclusão (KEITA; SÖDERHOLM, 2010). Células epiteliais, através dos receptores de reconhecimento padrão (PRR)

responsáveis pela detecção desses microorganismos, possuem receptores do tipo Toll (TLR) que desempenham um papel fundamental no reconhecimento de agentes patogênicos e seus produtos tóxicos como os LPS, componente de parede celular de bactérias gram negativas, capazes de ativar a produção de citocinas responsáveis pela resposta inflamatória (WELLS et al., 2011).

Uma população de células específicas chamadas de células T, são componentes essências do sistema imune adaptativo e foram reconhecidas capazes de controlar a homeostase do sistema imune e garantir a tolerância do mesmo. Células intestinais do tipo T CD4+ se distinguem pela expressão de alguns fatores de transcrição e citocinas, como apresentado na figura 2. Estas células estão localizadas principalmente na lâmina própria e após estimulação, as mesmas podem se diferenciar em quatro subtipos principais: T helper 1 (Th1), Th2, Th17 ou células T reguladoras (Treg). Células do tipo Th1 são essenciais para defesa do hospedeiro contra infecção microbiana intracelular, enquanto que células do tipo Th2 desempenham a função de eliminação por parasita.

Entretanto, já é reconhecido na literatura que células do tipo Treg são capazes de regular o sistema imune. Estes subconjuntos são responsáveis por expressar um fator de transcrição Foxp3 que desempenha um papel central na prevenção da inflamação intestinal. Um dos mecanismos explicados é que células dendríticas e células epiteliais intestinais conduziria a um acúmulo de interleucina 10 (citocina anti-inflamatória) através da produção de fator de crescimento transformador beta TGF beta (MAYNARD et al., 2012).

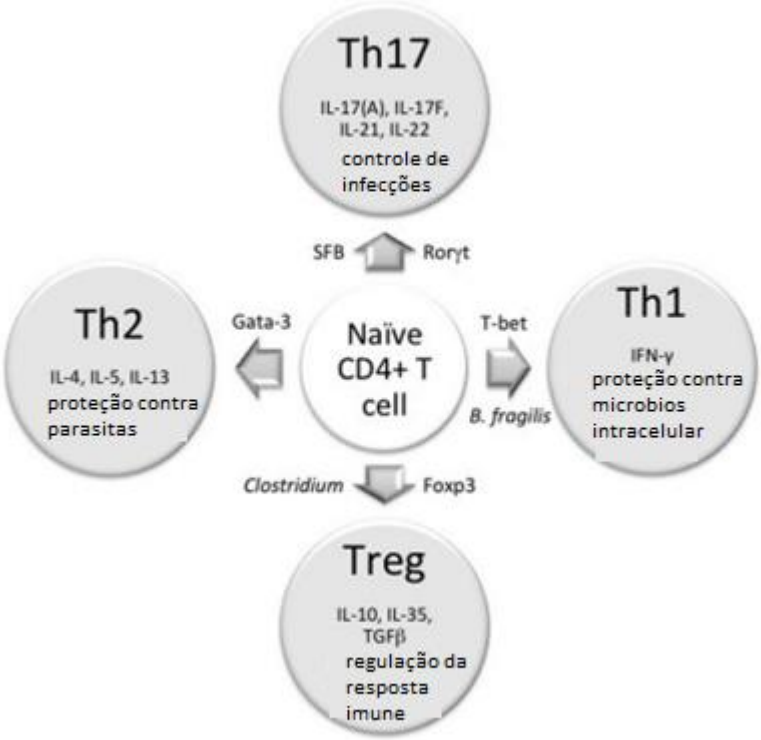


Figura 1 – Diferenciação de células T CD4+ induzidas por bactérias comensais. Adaptado de Wu (2012).

Em contrapartida, células do tipo mastócitos quando ativados tem a capacidade de liberar mediadores bioativos e citocinas pró inflamatórias com efeitos diretos sobre a função barreira e permeabilidade da mucosa intestinal. A interleucina 1 beta (IL1 β) assim como a interleucina 6 (IL6) são conhecidas como citocinas pró inflamatórias caracterizadas por desempenhar um papel importante na patogênese de doenças inflamatórias intestinais e correlacionam-se com o aumento da permeabilidade das junções de oclusão (AL-SADI et al., 2013; AMIN; DIEBEL; LIBERATI, 2009).

Um outro subconjunto de células T CD4+, denominados T-helper 17 (Th17), também presentes na lâmina própria, induz a defesa da mucosa contra patógenos.

Células Th17 são responsáveis pela produção de um subconjunto de citocinas como IL 17A, IL 21 e IL 23 expressos por um específico fator de transcrição chamado receptor nuclear retinoide orfão (RORyt) e estão envolvidos na ativação e recrutamento de neutrófilos. Células Th17 são responsáveis por estimular a liberação de proteínas antimicrobianas que irão promover a função barreira, e produção de muco através dos mecanismos de defesa físico e imunológico da mucosa intestinal (BLASCHITZ; RAFFATELLU, 2010; SONNENBERG; FOUSER; ARTIS, 2011).

Entretanto, alguns receptores de membrana do sistema imune inato chamados de Toll (do inglês, Toll-like receptors -TLRs) são considerados gatilhos para uma resposta metabólica à inflamação. Receptores do tipo TLR4 são ativados em resposta aos LPS produzidos por bactérias Gram-negativas. A ativação do TLR4 está relacionada com uma via inflamatória que resulta na ativação da via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF-kB) promovendo um processo de resistência à insulina e transcrição de genes inflamatórios induzidos por ácidos graxos saturados. No entanto, estudos adicionais propõem que alterações na microbiota intestinal em um processo de disbiose induzida, por exemplo, pela obesidade e gorduras provenientes da alimentação, podem potencializar a ativação desses receptores do tipo TLR4 nos tecidos, assim como no tecido muscular, favorecendo o aumento da permeabilidade intestinal em detrimento do aumento dos níveis sanguíneos de LPS. (VELLOSO; FOLLI; SAAD, 2015).

No experimento que resultou no aumento das concentrações de LPS circulantes realizado por Yue, et al. (2012), foi demonstrado um aumento na translocação

bacteriana com características distintas em diferentes regiões intestinais como no jejuno, íleo e cólon proximal, conduzindo a um aumento da função barreira e permeabilidade transcelular e paracelular da mucosa intestinal. Não há danos evidentes nas células epiteliais desses tecidos, porém sua função fica comprometida, sendo o íleo a região de maior alteração (YUE et al., 2012).

Já em outro estudo conduzido por Sukhotnik, et al (2008), mostraram que a administração de LPS em ratos (10mg/Kg por 48 horas), levou a um aumento de 50% na expressão do receptor TLR4 no jejuno diferente do íleo que não foi visto a mesma resposta sugerindo que a via de sinalização dos dois seguimentos seja diferente podendo ser devido a colonização e concentração de bactérias diferenciadas por regiões sendo o íleo apresentando uma maior.diversidade. A falência da função barreira intestinal após administração de LPS pode ser um dos maiores promotores de translocação bacteriana tanto por caminhos transcelular como também de forma paracelular em diferentes segmentos favorecendo um aumento de LPS na circulação sanguínea, fenômeno denominado endotoxemia metabólica. O intestino apresenta mecanismos específicos para tolerância ao LPS dada sua proximidade com a microbiota entérica e a forte resposta inata ao mesmo LPS (SUKHOTNIK et al., 2008).

Sendo assim, evidencia-se que fatores genéticos e ambientais interagem no controle da morfologia intestinal e podem ter um papel importante no desenvolvimento de doenças. Entretanto, não é evidenciado na literatura estudos envolvendo o exercício físico nesses processos metabólicos inter-relacionados.

2.4 Relação entre exercício físico e mucosa intestinal

O treinamento aeróbio pode ser considerado um dos principais responsáveis por criar as condições favoráveis para a obtenção do equilíbrio intestinal e manutenção da permeabilidade. Este balanceamento se dá pela diminuição do tempo transiente das fezes no trato gastrointestinal, reduzindo o contato prolongado de agentes patogênicos com a camada da mucosa intestinal e sistema circulatório (BERMON et al., 2015; WANG et al., 2015).

Alterações na função barreira a partir do exercício físico tem sido estudada com diferentes respostas na permeabilidade intestinal, porém os achados foram inconsistentes devido a divergência do tipo e intensidade de treino muitas vezes não especificada pelos autores (MARCHBANK et al., 2011; WIJCK et al., 2011). Entretanto, não está bem evidenciado na literatura se o dano tecidual, estresse metabólico, ou aumento da permeabilidade intestinal pode ser causado por exercícios repetitivos realizados em indivíduos treinados ou não em diferentes intensidades e duração (JANSSENDUIJGHUIJSEN et al., 2017).

Em um estudo com animais de experimentação, Luo et al (2014) mostrou que o exercício físico moderado realizado em piscina é capaz de atenuar a disfunção da barreira intestinal após a indução de um estresse crônico. A possível hipótese é devido ao aumento da resposta antimicrobiana na mucosa intestinal, porém os perfis pró e anti-inflamatório não foram avaliados (BEHAVIOR; XIANG, 2013b).

Embora se conheça que o treinamento físico pode melhorar a resposta microbiana no ambiente intestinal, a maioria dos estudos são realizados com exercício

espontâneo. Em um estudo pioneiro, Matsumoto et al (2008) mostrou o efeito do exercício voluntário aeróbio sobre a microbiota cecal e os possíveis benefícios para o trato gastrointestinal de ratos. Dentre os efeitos benéficos estão a redução do tempo de transito intestinal que poderiam limitar o tempo de contato entre a mucosa do cólon e o conteúdo de bactérias patogênicas, além do aumento da concentração ácidos graxos de cadeia curta, especificamente o butirato no conteúdo cecal. (MATSUMOTO et al., 2008).

Todavia, em um estudo com exercício controlado e alimentação rica em gordura, Kang et al. (2014) mostraram que somente o exercício físico é capaz de causar mudanças no microbioma intestinal independente da alimentação. Os autores explicam que o tipo de exercício, volume, intensidade e período de tempo estabelecido podem ser favoráveis para modificar as espécies de bactérias intestinais (KANG et al., 2014).

O treinamento aeróbio também foi capaz de reduzir significativamente as concentrações de LPS nos tecidos. O estudo de Oliveira et al. (2011) realizaram um programa de treino com duração de 1 hora, 5 vezes por semana por 8 semanas associado a uma dieta rica em gordura. Além a diminuição do LPS visto no fígado e músculo esquelético, os autores observaram uma supressão da sinalização de TLR4 em ambos os tecidos supracitados (OLIVEIRA et al., 2011).

Nesse contexto, o exercício físico também é conhecido por alterar a função de células do sistema imunológico de acordo com a intensidade. Alguns dos efeitos do exercício intenso (agudo) em células do sistema imune são as reduções nas atividades das células natural killer (NK) e do funcionamento das células B e T, especialmente

durante o tempo de recuperação e produção de radicais livres que podem aumentar temporariamente o risco de infecção (SIMPSON et al., 2012).

Vale ressaltar que apesar dos benefícios do treinamento físico sobre a mucosa intestinal evidenciado por alguns autores, os mecanismos envolvidos ainda não estão esclarecidos.

Alguns estudos relatam que o treinamento físico pode aumentar a excreção de ácidos biliares primários no trato gastrointestinal e suprimir a formação de ácidos biliares secundários. Esses ácidos biliares primários (ácidos eólicos) favorecem a atividade antimicrobiana que é mediada pela redução dos níveis de pH interno de bactérias, prejudicando a integridade da membrana e conduzindo a morte celular (CLARKE et al., 2014a).

Além disso, é evidenciado que o exercício físico de intensidade moderada parece proteger contra infecções por indução de alteração na atividade de macrófagos, células natural killer e neutrófilos, além do aumento de citocinas como por exemplo a interleucina 6 (IL6) e interleucina (IL 10) em detrimento do aumento de receptor solúvel de TNF-R e IL–1ra através da contração muscular contribuindo como mediadores para o efeito anti-inflamatório do exercício físico. (PETERSEN; PEDERSEN, 2005b).

Sendo assim, a promoção de conhecimento acerca dos efeitos do exercício físico sobre a barreira intestinal, bem como seus efeitos na morfologia e seu papel na interação com o sistema imune ainda não foram totalmente explorados.

3.0 JUSTIFICATIVA

Considerando tal contexto, a literatura é bem evidenciada a respeito do papel do exercício físico relacionado à saúde, assim como seus efeitos protetores contra ação de agentes infecciosos. Um dos processos para esse benefício está relacionado ao efeito anti-inflamatório do treinamento físico visto pelo aumento das concentrações de interleucina 10 (IL10). O músculo esquelético, tecido adiposo bem como leucócitos circulantes parecem ser importantes fontes dessa citocina após o treinamento (PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

Conforme exposto anteriormente, o exercício físico de forma intensa aguda provoca alterações no sistema imunológico e no intestino dos animais, porém a interação entre o exercício crônico moderado e sua função sobre a mucosa intestinal com um maior controle das variáveis envolvidas no treinamento físico, conforme proposto nesta investigação ainda não foi estudado.

Desta forma, a hipótese do presente estudo é que o exercício aeróbio moderado alterará o perfil de sinalização celular de mecanismos relacionados com a função barreira apresentando um efeito protetor sobre a mucosa.

4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do treinamento aeróbio moderado sobre a morfologia e a função barreira da mucosa intestinal em ratos Wistar submetidos ao processo inflamatório por LPS.

4.2 Objetivos Específicos

De forma específica, o presente trabalho avaliará o efeito do treinamento aeróbio:

- Na expressão gênica das citocinas: interleucina 1 beta (IL1β), interleucina 6 (IL6), interleucina 23 (IL23), interleucina 10 (IL10), claudina 1 e ocludina pela técnica de PCR em tempo real.
- Sobre a morfologia das vilosidades do jejuno e quantificação do grau de infiltrado no cólon pela técnica de análise histológica (H&E).

5.0 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da escola de Educação Física e Esportes da Universidade de São Paulo sob o protocolo 2015/05 e segue os princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

5.2 Protocolo experimental

Foram utilizados ratos albinos adultos machos, *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar. A amostra foi composta por 25 animais (oito semanas de idade) com massa corporal de 250 - 400 gramas alocados no biotério do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicados à Atividade Motora da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP). Os animais permaneceram por um período adaptativo de 15 dias no biotério e foram mantidos em gaiolas plásticas (três ou quatro animais por caixa), ambiente com ciclos de período claro/escuro invertido (12h/12h) e temperatura controlada de 22º a 24º C. Água e ração serão oferecidas *ad libitum* sendo a ração normoproteica (12% de proteína).

Os animais foram adaptados previamente ao ambiente do teste por uma semana durante 10 minutos/dia para reduzir o estresse externo. O teste progressivo até a exaustão consistiu em corrida em esteira rolante (AVS, São Paulo, Brasil) inclinada a 15 graus, sendo iniciado na velocidade de 6m/min, com incrementos de 3 m/min a cada três minutos até a exaustão do animal. Esse protocolo foi adaptado de Batista Jr ML et al., 2010 para o presente estudo (BATISTA et al., 2010). A velocidade máxima de corrida foi registrada e a distância total percorrida em metros foi calculada. A cada 4 semanas foi realizado um novo teste máximo até a exaustão para ajuste da intensidade do treinamento.

Após o período de familiarização em esteira os animais foram randomizados para compor dois grupos experimentais: grupo 1 – controle sedentário (CTRL; n = 13), grupo 2 – Treinado (T; n = 12). Após o período de treinamento, os animais foram divididos em 4 subgrupos para tratamento com injeção de 3 dias de LPS intraperitoneal, são eles: grupo 1 – controle sedentário (CTRL; n = 7), grupo 2 – treinado (T; n = 6), grupo 3 – controle sedentário com LPS (CTRL + LPS; n= 6) e grupo 4 – treinado com LPS (Treinado + LPS; n=6). O grupo treinado foi submetido a uma sessão de treinamento físico aeróbio de forma contínua em intensidade moderada, correspondente a 65% da velocidade máxima atingida no teste de exercício físico progressivo até a exaustão, por 60 minutos, 5 vezes por semana, durante 8 semanas. A figura 2 ilustra o desenho experimental do trabalho.

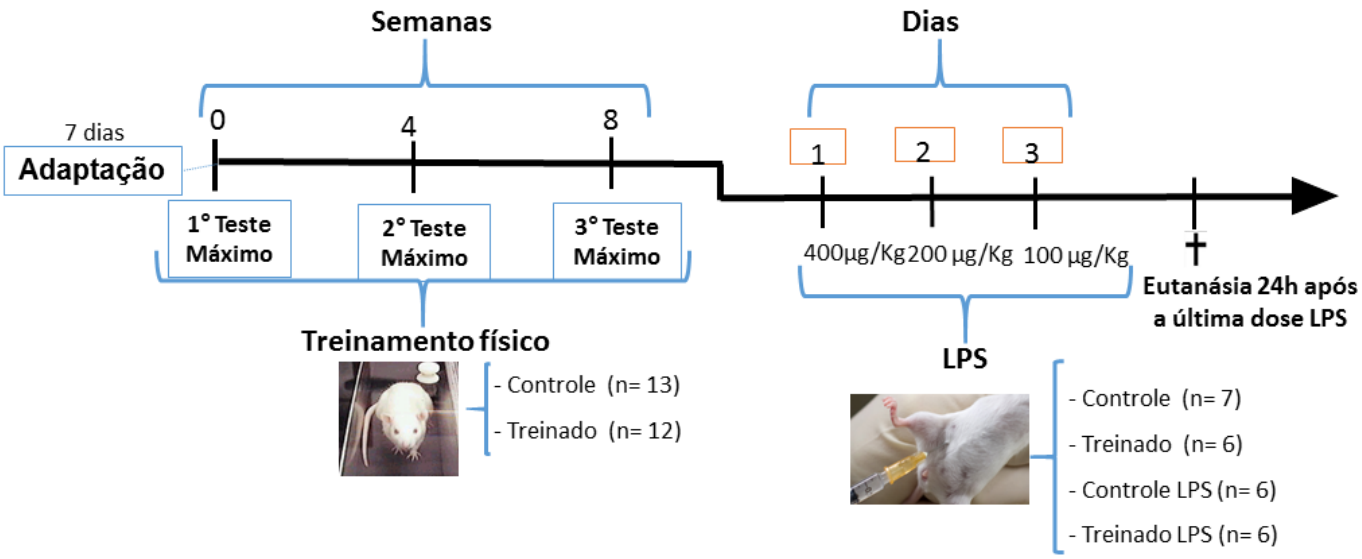


Figura 2 - Desenho experimental.

5.3 Consumo alimentar e massa corporal

O consumo alimentar foi registrado em dias alternados e todos os animais eram pesados semanalmente para averiguação da massa corporal. Foram colocados 350g de ração por dia em cada caixa dos animais. A sobra da ração era pesada em uma balança calibrada (GEHAKA LTDA) 48h depois para então fazermos o cálculo do consumo de ração nas horas posteriores.

5.4 Administração de lipopolissacarídeo de Eschechia coli

Com o objetivo de induzir um quadro inflamatório, foi administrado de forma intraperitoneal lipopolissacarídeo (LPS) de escherichia coli diluído em tampão fosfato 0,1M, PH 7,4 (PBS). As doses foram regressivas iniciando com 400 µL/Kg peso, 200 µL/Kg e 100 µL/Kg respectivamente por 3 dias consecutivos mantendo um quadro de inflamação crônica de acordo com o protocolo adaptado de (OLIVEIRA et al., 2010). O grupo controle seguiu o mesmo protocolo do grupo experimental, porém receberam apenas o veículo de diluição do LPS.

5.5 Coleta das amostras

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 48h após a última dose de injeção de LPS. Parte do cólon distal e região mediana do jejuno foram cuidadosamente retirados, colocados em nitrogênio líquido e imediatamente congelados em freezer -80ºC para análises posteriores de RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction* – Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa).

5.6 Análise morfológica intestinal

O material foi coletado através do procedimento descrito acima e fixado em formaldeído 10% por 4 horas. O material foi retirado da cortiça e acomodado sobre uma

esponja em um cassete plástico, no qual procedeu ao processo de fixação por mais 4 horas. Ao término deste período, o cassete com o material colocado foi mantido em álcool 70% até ser incluído em parafina.

Para realização das análises citadas, foram feitos cortes não seriados de 5 µm e posteriormente as amostras foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). A captura das imagens foi realizada com aumento de 200x e objetiva de 20x. O registro das imagens foi obtido através de um computador acoplado a um microscópio de luz (Nikon, Japão) e conectado a um sistema fotográfico (Olympus, Montreal, Canada). As análises morfométricas foram realizadas a partir da captura de 10 campos por imagens e quantificação de 10 vilosidades por animal a partir do software de análise de imagem Image ProPlus v.5.2 (Média Cybernetics, Bethesda, USA).

5.7 RT-PCR

5.7.1 Extração de RNA

A partir de amostras obtidas do cólon distal, a extração de RNA foi realizada com trizol (Carlsbad, CA, Estados Unidos). O tecido foi macerado com homogeneizador eletrico por 5 minutos, adicionados 200 µL de cloroformio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e após agitação em vortex por 15 segundos, as amostras foram mantidas em gelo por três minutos para posterior centrifugação 12.000g (15 min. 4°C).

A fase aquosa superior foi retirada e adicionado 500 µL de isopropanol (Merck). As amostras foram acondicionadas em gelo por 10 minutos para, em seguida, serem novamente centrifugadas a 12.000g (15 min. 4°C) com o objetivo de preciptar o RNA. O

sobrenadante foi desprezado e o precipitado, após lavagem com 1 ml de etanol 75% (Merck) em água DEPC (Invitrogen), foi centrifugado a 7.500g (5 min. 4°C) desprezando outra vez o sobrenadante procedendo-se a secagem do preciptado que posteriormente foi re-suspendido em água DEPC 0,1%.

A quantificação do RNA foi realizada no nanodrop. Concentrações do RNA foram determinadas mensurando a absorbância de 260/280 nm. Todas as amostras de RNA foram tratadas com DNase para remover qualquer resíduo de DNA genômico.

A integridade do RNA foi testada em gel de agarose 1% com brometo de etídeo em tampão TAE (tris acetato 40 mM – EDTA 1 mM) através da observação das bandas correspondentes às subunidades 30S e 50S do RNA ribossomal.

5.7.2 Sintese de cDNA

A partir do RNA foi realizada a síntese do cDNA pela reação da transcriptase reversa (RT). Para tal, foi utilizado 2 µg de RNA total e incubadas as amostras com 0,5 µg/ml de oligo dt (12-18) a 65° por 5 minutos para obtenção da primeira fita de cDNA. A transcrição reversa das amostras foi realizada em volume total de 20 µl contendo 3U de RNAsin (Promega, Madison, USA), 10 mM de dNTPs, 0,1 DTT, 1x tampão de enzima e 2,5U de *superScript Reverse transcriptase II* (Invitrogen, Brasil). Após incubação por 1 hora a 42°C, a temperatura foi elevada a 95°C por 5 minutos e o cDNA obtido foi estocado em freezer – 20°C.

5.7.3 Amplificação do DNA – Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos foram desenhados através do programa primer blast (NCBI) e sintetizados pela empresa Invitrogen. A análise da expressão gênica foi feita pelo sistema de detecção do produto específico amplificado no equipamento 7500 *real time PCR system* (Applied-Biosystems) na presença do composto fluorescente *SYBR green* PCR Master Mix. A otimização da reação *real-time* PCR foi feita conforme as intruções do fabricante, corrigido para volume final de 20 µl por reação. As condições de PCR foram padrão (protocolo do kit SYBR-green Master Mix) e todos os reagentes foram fornecidos pelo kit. Depois da otimização, os primers foram utilizados na concentração de 200 nM para detecção e o gene da ciclofilina para controle interno.

O produto da geração do PCR foi monitorizado por medição do aumento da fluorescência provocada pela ligação do *SYBR green* na cadeia dupla de DNA em cada fase de anelamento. A curva de dissociação observada na análise de *SYBR green* foi gerada no final da reação para verificar se um único produto foi amplificado. Cada amostra foi analisada em duplicata. Quantidades relativas de expressão do gene alvo foram comparadas após a normalização dos valores de controle interno (ΔCT). Mudanças em vezes na expressão de mRNAs, foram calculados utilizando as diferenças em valores dos ΔCT entre os grupos ΔΔCT e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

5.8 Quantificação dos infiltrados do cólon

Para compreensão do grau de inflamação gerado pelo LPS e efeito do treinamento físico aeróbio, utilizamos a avaliação de quantificação de infiltrado no cólon distal. Os resultados morfológicos das imagens foram confirmados pela análise de histoquímica por hematoxilina e eosina (H&E).

Para todas as amostras, 10 campos independentes foram adquiridos em alta resolução, sendo que cada pixel corresponde a 152,4 µm. A área total para cada campo foi igual a 8,53 x 6,40 polegadas, sendo 1280 pixels de largura e 960 pixels de altura equivalente a 192 grades de cruzes analisada com o software ImageJ 1.44d (National Institute of Health, EUA). Foram consideradas para cálculo somente as cruzes compostas na área do infiltrado inflamatório da mucosa.

Tabela 1. Sequência de primers e iniciador utilizados para realização de RT-PCR

PRIMERS	GENBANK N°	SENSE 5' – 3'	ANTISENSE 3' – 5'
CLDN1	NM_0010684.6	CGAGAAAGAACAGCTCCGTTT	GTGTCTCTGGCAAGCTGACT
OCLN	NM_031329.2	TTTCATGCCTTGGGGATTGAG	GTGCAGAGTGGAGAGCTGATTA
IL23	-	AAAAGTGACGTGCCCCGTAT	TGCAAACAGAACTGGCTGTTG
IL17A	NM_001106897.1	CCCTGCGTTTCTCTGCAAAC	CAGGGTGGAAGGCAGACAAT
IL1B	-	GACTTCACCATGGAACCCGT	GGAGACTGCCCATTCTCGAC
IL6	-	AGAGACTTCCAGCCAGTTGC	AGTCTCCTCTCCGGACTTGT
IL10	-	TTGAACCACCCGGCATCTAC	CCAAGGAGTTGCTCCCGTTA
CICLOFILINA	**-**	TGGCAAGCATGTTGGGTCTTTGGGAAG	GGTGATCTTCTTGCTGGTCTGCCATTC

6.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados em média ± erro padrão. Os dados de peso corporal e consumo alimentar foram comparados por teste t de Student. Posteriormente, todos os dados comparados por mais de dois grupos foram analisados por meio de análise de variância ANOVA de dois caminhos seguido pelo teste de comparações múltipla de Tukey em caso de significância. O nível de significância adotado nesse estudo foi de $p < 0,05$. As análises foram realizadas com o pacote estatístico *GraphPad Prism* 5 (GraphPad software, Inc., San Diego, CA, EUA).

7.0 RESULTADOS

Para melhor entendimento dos resultados obtidos neste estudo, apresentaremos os dados em subtópicos. Inicialmente serão apresentados os resultados do efeito do treinamento físico aeróbio sobre a massa corporal e consumo de ração dos animais. Posteriormente foi introduzido o LPS para verificação dos mesmos parâmetros anteriores e análise da morfometria da camada mucosa dos animais.

7.1 Efeito do treinamento físico aeróbio sobre a massa corporal e consumo de ração dos animais.

A figura 3A ilustra o desempenho físico dos grupos após a realização do teste máximo até exaustão. O grupo treinado apresentou uma distância máxima percorrida significativamente maior em relação ao grupo sedentário visto na quarta e oitava semana de treinamento ($p < 0,05$). Assim como, o grupo treinado também apresentou uma melhora estatisticamente significativa do desempenho físico ao longo das semanas de intervenção.

O delta da massa corporal é a diferença do peso final subtraído do peso corporal inicial dos animais submetidos a 8 semanas de treinamento físico. O grupo treinado apresentou um ganho de peso significantemente menor comparado ao grupo sedentário ($p < 0,05$) conforme demonstra a figura 3C. Não houve diferença significativa entre os grupos no consumo de ração, (figura 3D, $p > 0,05$).

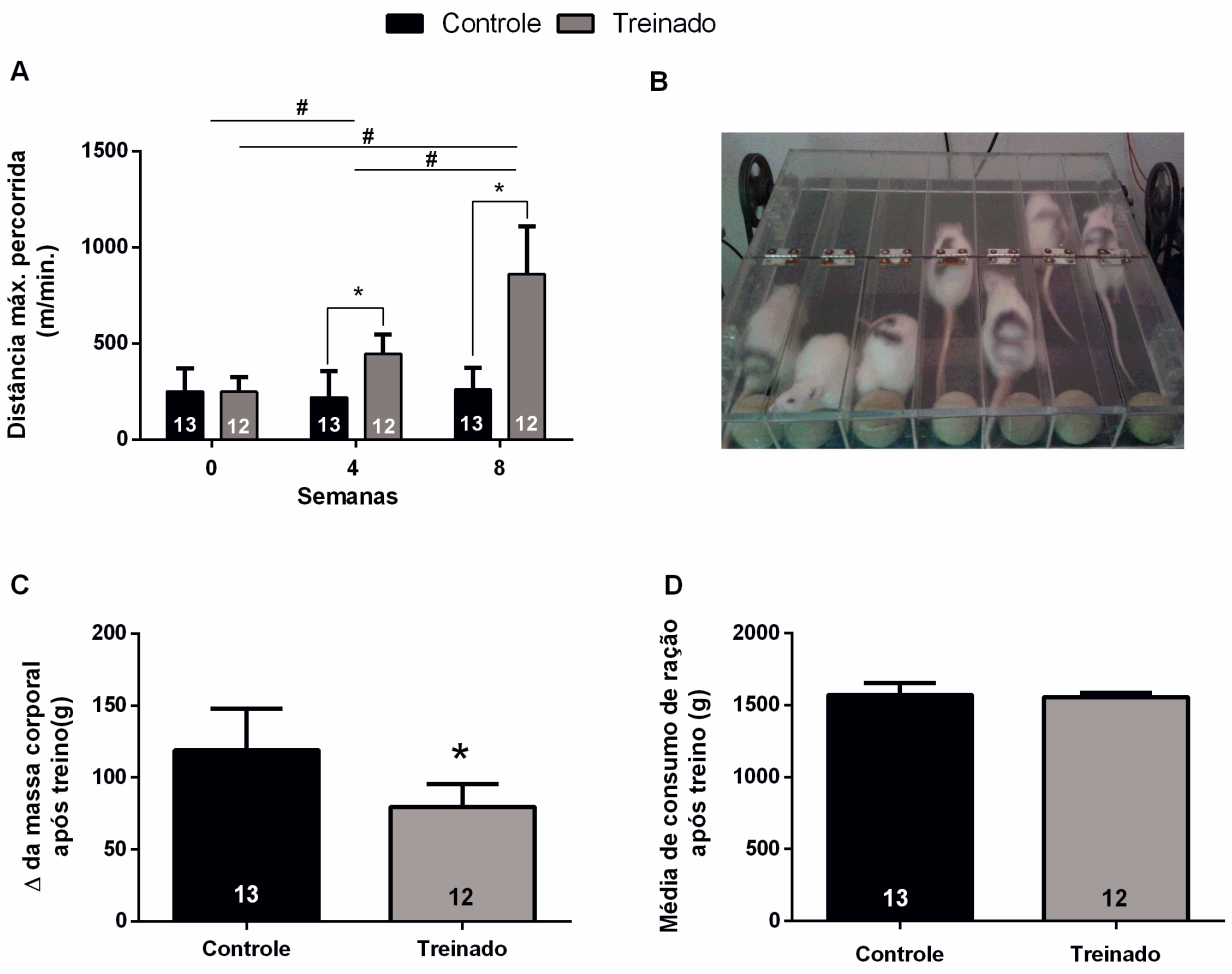


Figura 3 – Efeito do treinamento físico sobre os parâmetros fisiológicos. A. Distância máxima percorrida após a realização do teste máximo até a exaustão. B. Imagem ilustrativa da esteira de treinamento. C. Escore delta (Δ) da massa corporal representado em gramas. D. média do consumo de ração dos animais após 8 semanas de treinamento físico. Resultados estão expressos como média ± erro padrão. *Controle *vs* treinado ($p < 0,05$) #Diferença significante entre as semanas de treinamento físico ($p < 0,05$).

7.2 Efeito do treinamento físico aeróbio sobre a massa corporal e mucosa intestinal após indução da inflamação.

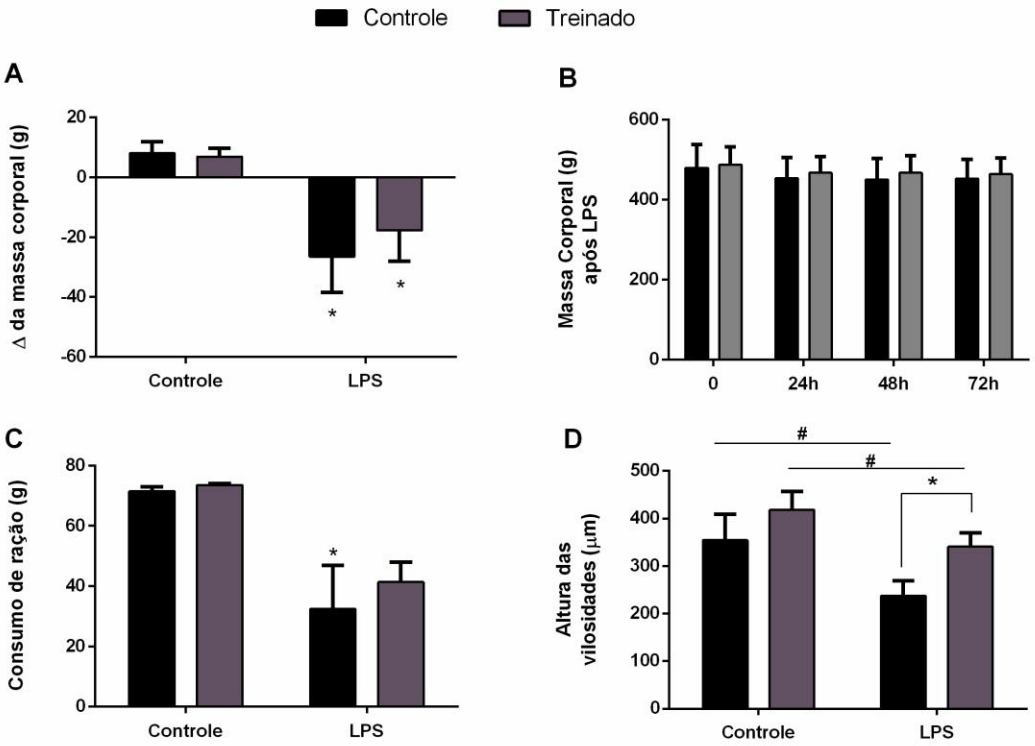
Após a intervenção com 3 dias de LPS, foi verificado novamente o delta da massa corporal entre grupos. Ambos os grupos (CTRL + LPS e treinado + LPS) apresentaram diferença significativa em relação a sua condição pré (sem LPS) visto na figura 4A.

Não foi observado diferença estatística na comparação da massa corporal entre os grupos CTRL + LPS e treinado + LPS durante os três dias de administração das doses de LPS (figura 4B). Entretanto, quando comparados o consumo de ração a diferença foi significativa entre o grupo CTRL + LPS e seu controle sem LPS. Enquanto que o grupo treinado + LPS apresentou somente uma atenuação do consumo em relação ao grupo treinado sem significância (figura 4C).

Podemos observar que após a indução da inflamação com LPS há uma diminuição das vilosidades intestinais, capturadas da região mediana do jejuno, vistas nos dois grupos (treinado e sedentário), porém o grupo treinado + LPS apresentou uma atenuação da perda significativamente menor que o grupo CTRL + LPS. Essa diferença estatística é vista também entre o mesmo grupo treinado e treinado + LPS, sendo este último apresentando uma altura da vilosidade reduzida em relação ao treinado. Da mesma forma, os grupos controle e CTRL + LPS quando comparados entre si apresentaram diferença significativa (figura 4D).

Curiosamente, nenhuma diferença estatística foi visto entre os grupos controle e treinado + LPS mostrando a importância do treinamento físico na atenuação da perda das vilosidades intestinais (figura 4D).

Conforme observado na imagem representativa das figuras 4F e 4H, os animais treinados apresentam uma distribuição das vilosidades preservadas semelhante aos animais sedentários independente da ação do LPS (figura 4E). Em contrapartida, os animais CTRL + LPS tiveram as vilosidades danificadas e com maior proporção de infiltrado no tecido conjuntivo (figura 4G).


Controle
Treinado
A
Δ da massa corporal (g)
20
0
-20
-40
-60
*
*
Controle
LPS
B
Massa Corporal (g) após LPS
600
400
200
0
0
24h
48h
72h
C
Consumo de ração (g)
80
60
40
20
0
*
Controle
LPS
D
Altura das vilosidades (μm)
500
400
300
200
100
0
#
#
*
Controle
LPS

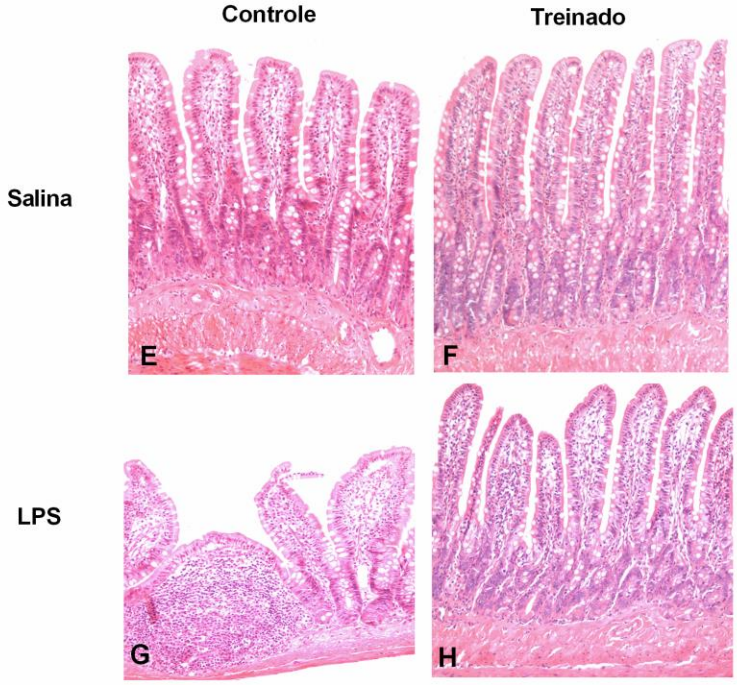

Controle
Treinado
Salina
LPS
E
F
G
H

Figura 4 – Parâmetros fisiológicos e morfológicos após desafio com LPS. A. Escore delta (Δ) da massa corporal dos animais comparado entre grupos após intervenção com LPS. B. Massa corporal durante 3 dias de tratamento com LPS. C. Média do consumo de ração após a intervenção. D. Análise morfométrica das vilosidades do jejuno dos animais treinados e sedentários em diferentes condições de intervenção, coradas com hematoxilina e eosina. E. Imagem representativa do grupo controle. F. Imagem representativa do grupo treinado. G. Imagem representativa do grupo sendentário com LPS. H. Imagem representativa do grupo treinado com LPS. * Diferença significativa entre os grupos treinado e controle ($p < 0,05$) e # Diferença significante entre o mesmo grupo ($p < 0,05$).

7.3 Efeito do treinamento aeróbio sobre o perfil inflamatório da mucosa do cólon.

As imagens representativas das figuras 5A e 5C mostram que o grau de infiltrado não é significante quando não há processo inflamatório, sendo a integridade da mucosa mantida. Já entre os grupos com ação do LPS (figuras 5B e 5D), nota-se a presença do infiltrado inflamatório acentuada no grupo CTRL + LPS (figura 5B) e de forma evidente a atenuação do infiltrado nos animais treinados + LPS conforme visto na imagem representativa da figura 5D. Na figura 5E, conseguimos quantificar o grau de infiltrado, sendo a única diferença significativa entre os grupos controle e CTRL + LPS.

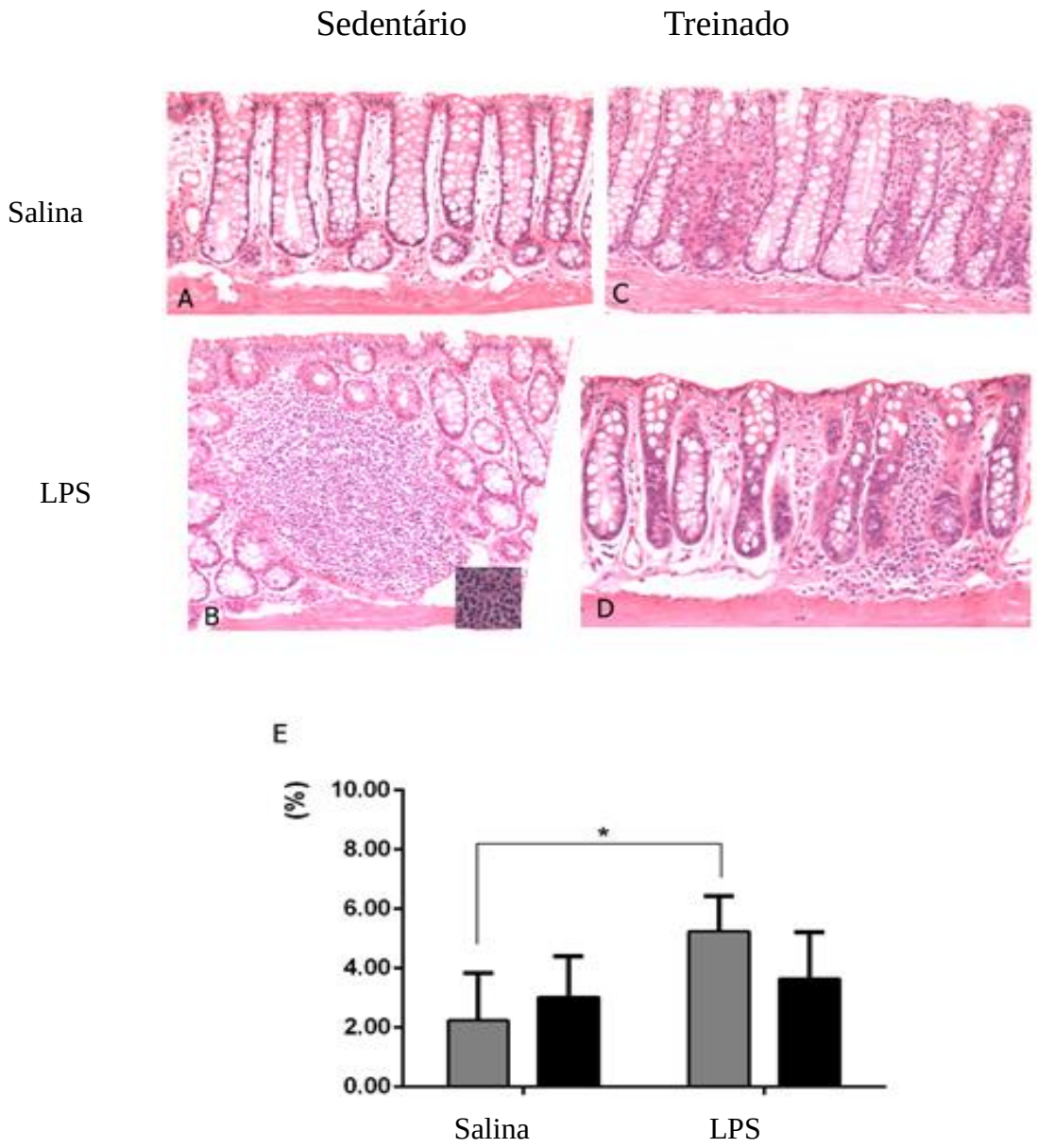


Figura 5 – Análise histoquímica do cólon distal corada com H&E. A. Morfologia do colón de um animal sedentário controle. B. infiltrado da análise morfológica de um animal controle após LPS. C. analise morfológica de um animal treinado sem LPS e treinado + LPS (D). E. Percentual de infiltrado inflamatório comparado entre grupos. * Diferença significante entre os grupos. ($p < 0,05$). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) seguida de *post-hoc* tukey.

7.4 Efeito do treinamento físico sobre o perfil gênico

Dos genes para interleucinas analisados, não houve diferença significativa entre os grupos quando analisado a IL1β e IL6 (figura 6A e figura 6B).

O aumento da expressão gênica da IL 23 foi significativo entre os animais CTRL + LPS e o grupo controle, porém o mesmo não é visto para o gene IL 10 (figura 6C e figura 6D)

Além disso, em relação a função barreira da mucosa intestinal a claudina 1 foi a única que se mostrou aumentada de forma significante no grupo CTRL + LPS em relação ao grupo controle (figura 6E). Apesar da expressão aumentada da ocludina visto no grupo treinado, este aumento não foi significativo (figura 6F).

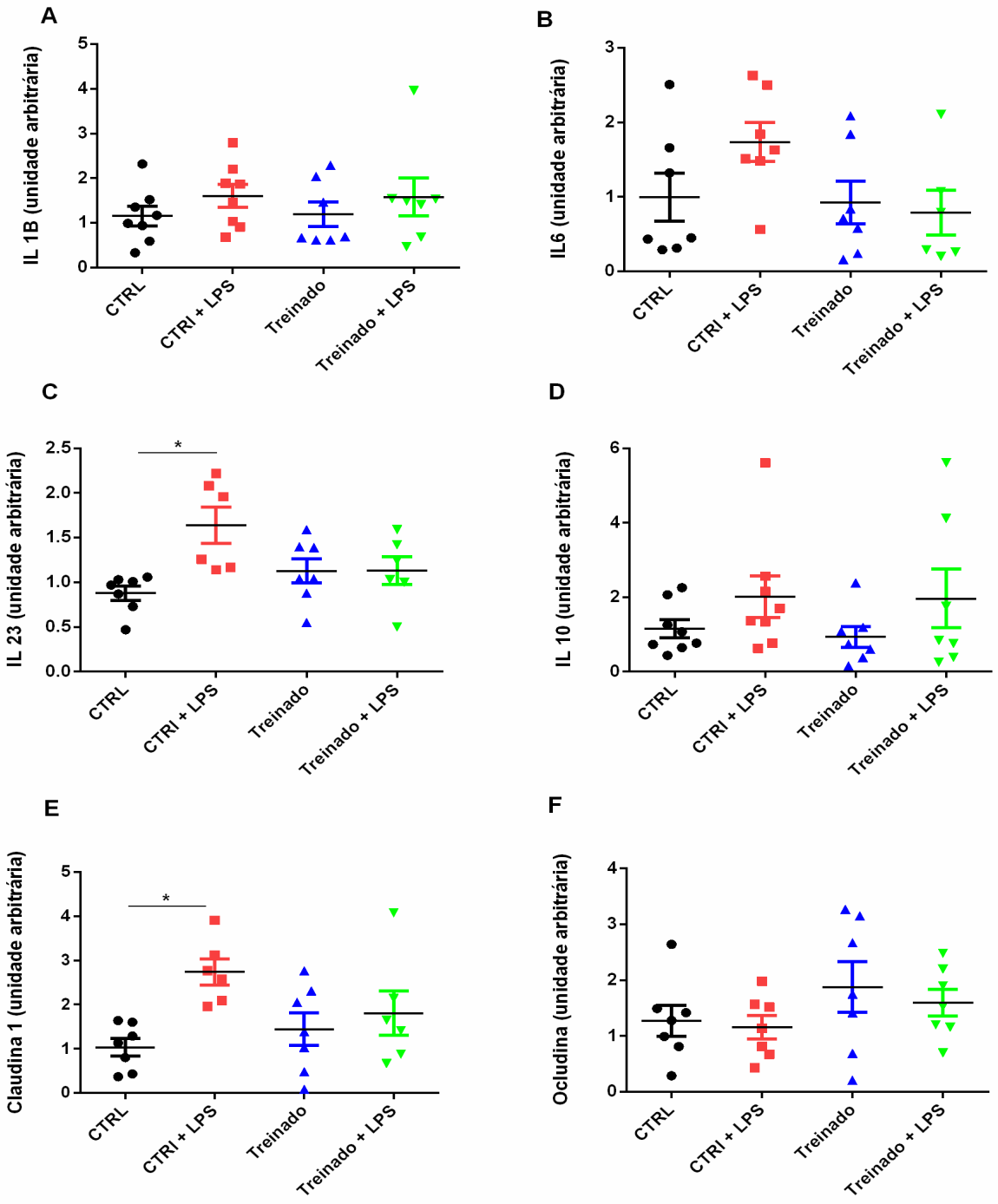


Figura 6 – Expressão gênica de interleucinas e genes relacionados à função barreira. A. interleucina 1β, B. Interleucina 6, C. Interleucina 10, D. Interleucina 23, E. expressão gênica da claudina 1, F. expressão gênica da ocludina. Os dados estão representados na forma de média ± EPM. * Diferença significante entre os grupos ($p < 0,05$). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) seguida de *post-hoc* tukey.

8.0 DISCUSSÃO

Dentre os diversos benefícios evidenciados pelo treinamento físico de intensidade moderada, o principal achado deste estudo foi o efeito protetor do exercício aeróbio sobre as vilosidades intestinais e mucosa do cólon distal diante da indução de uma inflamação sistêmica. Os animais treinados apresentaram uma melhor distribuição das vilosidades intestinais e altura da região do jejuno sendo sua estrutura preservada com menor grau de infiltrado. Em contrapartida, os animais sedentários quando desafiados com LPS apresentaram maiores danos à camada epitelial e lâminas própria com um provável aumento de apoptose celular pela maior ativação de caspase 3 conforme visto em trabalhos confirmando uma redução no número de células do epitélio intestinal e alteração na altura das vilosidades ((SUKHOTNIK et al., 2008; WILLIAMS et al., 2013), porém marcadores apoptóticos não foram testados neste estudo.

Muitos trabalhos que mencionam aumento de LPS circulantes estão correlacionados com dietas ricas em gorduras ou obesidade que levam a uma endotoxemia metabólica modificada pela diversidade da microbiota intestinal induzindo a inflamação, porém o trabalho de Han et al (2016) confirma o dano a integridade da mucosa quando desafiado com LPS de forma sistêmica conforme mostrado neste estudo (HAN et al., 2016). Uma das limitações deste trabalho é ausência da avaliação da diversidade da microbiota intestinal para corroborar com tais resultados.

Além disso, observamos também que os genes relacionados a função barreira (claudina 1 e ocludina) agem de forma independente diante do desafio, visto que a expressão gênica da claudina 1 foi aumentada de forma significativa no grupo CTRL +

LPS em relação ao seu controle e o mesmo não foi visto quando analisado a expressão da ocludina. O potencial aumento da claudina 1 sugere uma possível ação compensatória ao dano tecidual sem afetar a resistência transepitelial no tecido confirmando a ação da ocludina no controle da barreira paracelular de macromoléculas. Esses dados estão correlacionados com resultados anteriores feitos em animais que foram silenciados o gene para claudina e não houve aumento da depleção da ocludina nem aumento do fluxo paracelular de macromoléculas. Eles também observaram que a super expressão de algumas claudinas aumenta o número de poros sem afetar o tamanho, porém mais estudos são necessários para melhor esclarecimento dos dados (AL-SADI et al., 2011).

As análises das imagens representativas dos tecidos corados com H&E nesse estudo mostraram um significante aumento do grau de infiltrado sobre a camada mucosa e submucosa do colón dos animais sedentários inflamados e o potencial efeito benéfico do exercício físico sobre o tecido mostrando uma atenuação do efeito nos animais treinados.

Concomitantemente a este aumento da inflamação, a expressão gênica da IL 23 aumentou no grupo CTRL + LPS em relação ao seu controle, sendo produzida principalmente por macrófagos. Conforme demonstrado na literatura, o aumento da IL23 promove uma indução de linfócitos do epitélio intestinal e monócitos inflamatórios relacionados com a promoção da inflamação intestinal crônica (XU et al., 2014). Deve-se destacar que não foi encontrado na literatura estudos que avaliam a quantificação de infiltrado inflamatório, constituído de neutrófilos, linfócitos e alguns macrófagos, sobre a mucosa intestinal. Alguns trabalhos relacionam o grau de infiltrado a quantificação e

desenvolvimento de células tumorais inclusive no trato gastrointestinal (CHAN et al., 2013; COSTA et al., 2014).

Podemos observar também em nosso estudo que apesar do aumento das interleucinas IL1β e IL6 nos animais sedentários com LPS em concordância com a literatura, essa diferença não foi significativa provavelmente por mecanismos específicos de tolerância ao LPS dado a mudança da diversidade da microbiota intestinal e pela capacidade adaptativa da resposta imune ao longo de três dias de tratamento conforme visto em estudos anteriores com o mesmo modelo animal (SUKHOTNIK et al., 2008).

Em contrapartida, o aumento do grau de inflamação sistêmica induzida pelo LPS leva ao reconhecimento pelo seu receptor TLR4 nos tecidos imunocompetentes. Este receptor ativa um fator de transcrição NF-kB que ativa mediadores inflamatórios como a IL1B para o desenvolvimento de uma resposta imune, porém apesar de ser uma limitação deste estudo a análise de LPS, o exercício reduz as concentrações plasmáticas do LPS dos indivíduos treinados em comparação aos sedentários. Essa diferenciação pode ser justificada por uma adaptação fisiológica do metabolismo (BARBERIO et al., 2014).

Além disso, já é evidenciado que o exercício físico produz marcadores que induzem uma cascata de citocinas diferentes daquelas induzidas pela inflamação. Quanto aos níveis circulantes aumentados da IL6 nos animais treinados, a resposta ao exercício físico se dá pela sua ação anti-inflamatória inibindo os receptores solúveis de IL-1ra e TNF-R e aumentando os níveis circulantes de IL10 (PETERSEN; PEDERSEN, 2005a).

Sendo assim, os resultados do aumento da IL10 nos grupos treinado com LPS e sedentário com LPS, apesar de não ser significativo demonstra uma resposta adaptativa e compensatória ao aumento da IL6. Já no grupo treinado + LPS, este aumento da IL10 pode sugerir uma ação protetora do treinamento físico sobre a inflamação. A síntese de IL10 é feita principalmente a partir de uma linhagem de monócitos inibindo a produção de IL1β e macrófagos inflamatórios derivados da ativação do LPS (KUMAR; INFECTION, 2000; SATTLER et al., 2014).

Diante dos parâmetros fisiológicos do treinamento físico moderado, os animais que foram submetidos ao treinamento tiveram um menor ganho de peso em relação aos animais sedentários sendo explicado pelo maior gasto energético já que o consumo de ração não sofreu alteração. Da mesma forma, podemos observar o efeito preventivo do exercício físico quando exposto a uma inflamação crônica. A perda de peso é vista nos dois grupos de animais (sedentários e treinados) com LPS, porém fica claro a atividade anti-inflamatória do exercício como reportada na literatura promovendo uma atenuação na perda de peso dos animais treinados com LPS (BILSKI et al., 2013).

9.0 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo nos permitiram concluir que o exercício físico aeróbio moderado reduz a resposta inflamatória da mucosa intestinal, principalmente das regiões do jejuno e cólon distal promovendo um efeito protetor sobre a perda das vilosidades intestinais visto também através dos biomarcadores da função barreira, além da atenuação na perda de peso corporal após a inflamação.

Sendo assim, esses dados sugerem que o exercício aeróbio moderado pode ser uma estratégia eficaz para saúde intestinal.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AL-SADI, R. et al. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. p. 1054–1064, 2011.

AL-SADI, R. et al. Mechanism of IL-1β modulation of intestinal epithelial barrier involves p38 kinase and activating transcription factor-2 activation. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 12, p. 6596–6606, 2013.

AMIN, P. B.; DIEBEL, L. N.; LIBERATI, D. M. Dose-Dependent Effects of Ethanol and E. Coli on Gut Permeability and Cytokine Production. **Journal of Surgical Research**, v. 157, n. 2, p. 187–192, 2009.

ANGELOW, S.; AHLSTROM, R.; YU, A. S. L. Biology of claudins. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 295, n. 4, p. F867–F876, 2008.

BARBERIO, M. D. et al. Systemic LPS and Inflammatory Response during Consecutive Days of Exercise in Heat. p. 262–270, 2014.

BATISTA, M. L. et al. Exercise training changes IL-10/TNF-?? ratio in the skeletal muscle of post-MI rats. **Cytokine**, v. 49, n. 1, p. 102–108, 2010.

BEHAVIOR, B.; XIANG, D. The Effects of Moderate Exercise on Chronic Stress-Induced Intestinal Barrier Dysfunction and Antimicrobial Defense. n. October 2016, 2013a.

BEHAVIOR, B.; XIANG, D. The Effects of Moderate Exercise on Chronic Stress-Induced Intestinal Barrier Dysfunction and Antimicrobial Defense. n. January, 2013b.

BERMON, S. et al. The microbiota: an exercise immunology perspective. **Exercise immunology review**, v. 21, n. 22, p. 70–79, 2015.

BILSKI, J. et al. THE IMPACT OF PHYSICAL ACTIVITY AND NUTRITION ON

INFLAMMATORY BOWEL DISEASE : THE POTENTIAL ROLE OF CROSS TALK. n. 4, p. 143–155, 2013.

BLAIR, S. N. and body composition. v. 47, n. 12, p. 2535–2541, 2016.

BLASCHITZ, C.; RAFFATELLU, M. Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 2, p. 196–203, 2010.

BROOM, D. R. et al. Exercise-induced suppression of acylated ghrelin in humans. p. 2165–2171, 2007.

CAMILLERI, M. et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 24, n. 6, p. 503–12, 2012.

CAMPBELL, S. C. et al. The Effect of Diet and Exercise on Intestinal Integrity and Microbial Diversity in Mice. p. 1–17, 2016.

CHAN, I. H. et al. Interleukin-23 is sufficient to induce rapid de novo gut tumorigenesis , independent of carcinogens , through activation of innate lymphoid cells. v. 7, n. 4, p. 842–856, 2013.

CLARKE, S. F. et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. **Gut**, p. 1–8, 2014a.

CLARKE, S. F. et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. p. 1913–1920, 2014b.

CLATWORTHY, J. P.; SUBRAMANIAN, V. Stem cells and the regulation of proliferation, differentiation and patterning in the intestinal epithelium: Emerging insights from gene expression patterns, transgenic and gene ablation studies. **Mechanisms of Development**, v. 101, n. 1–2, p. 3–9, 2001.

COSTA, F. et al. Cancer Medicine. p. 201–214, 2014.

COSTELLO, E. E. K. et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **Science**, v. 326, n. 5960, p. 1694–7, 2009.

FANNING, A S.; MITIC, L. L.; ANDERSON, J. M. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 10, n. 6, p. 1337–45, 1999.

GUNZEL, D.; YU, A. S. L. **Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability**. [s.l: s.n.]. v. 93

HAN, J. et al. Effect of Polysaccharides from Acanthopanax senticosus on Intestinal Mucosal Barrier of Escherichia coli Lipopolysaccharide Challenged Mice. v. 29, n. 1, p. 134–141, 2016.

HOOPER, L. V et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. **Science (New York, N.Y.)**, v. 291, n. 5505, p. 881–4, 2001.

ITALLIE, C. M. VAN et al. Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. p. 2844–2852, 2010.

JANSSENDUIJGHUIJSEN, L. M. et al. Adaptation of exercise-induced stress in well-trained healthy young men. v. 1, p. 86–99, 2017.

JEUKENDRUP, A. E. et al. Relationship between gastro-intestinal complaints and endotoxaemia , cytokine release and the acute-phase reaction during and after a long-distance triathlon in highly trained men. v. 55, p. 47–55, 2000.

KANG, S. S. et al. Diet and exercise orthogonally alter the gut microbiome and reveal independent associations with anxiety and cognition. **Molecular neurodegeneration**, v. 9, n. 1, p. 36, 2014.

KEITA, A.˚ V; SÖDERHOLM, J. D. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 22, n. 7, p. 718–733, 2010.

KIESSLICH, R. et al. Local barrier dysfunction identified by confocal laser endomicroscopy predicts relapse in inflammatory bowel disease. 2012.

KRUZEL, M. L. et al. Lactoferrin decreases LPS-induced mitochondrial dysfunction in cultured cells and in animal endotoxemia model. n. March 2009, 2010.

KUMAR, A.; INFECTION, W. D. C. I.-. The Therapeutic Potential of Interleukin 10 in Infection and Inflammation. p. 529–538, 2000.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2 ⌬⌬ C T Method. v. 408, p. 402–408, 2001.

MAGALHA, D. C. et al. Effects of Aerobic Exercise Training on Cardiac Renin-Angiotensin System in an Obese Zucker Rat Strain. v. 7, n. 10, p. 1–10, 2012.

MANN, E. R. et al. Compartment-specific immunity in the human gut: properties and functions of dendritic cells in the colon versus the ileum. **Gut**, p. 1–15, 2015.

MANUSCRIPT, A. response to pathogens. v. 16, n. 1, p. 4–9, 2014.

MARCHBANK, T. et al. The nutriceutical bovine colostrum truncates the increase in gut permeability caused by heavy exercise in athletes. p. 477–484, 2011.

MARTINS, C. et al. Effects of exercise on gut peptides , energy intake and appetite. 2006.

MATSUMOTO, M. et al. Voluntary Running Exercise Alters Microbiota Composition and Increases n-Butyrate Concentration in the Rat Cecum. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 72, n. 2, p. 572–576, 2008.

MAYNARD, C. L. et al. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 231–41, 2012.

MENARD, S, N. C.-B. AND M. H. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. v. 3, n. 3, p. 247–259, 2010.

NIGHOT, P. K.; HU, C. A.; MA, T. Y. Autophagy Enhances Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier Function by Targeting Claudin-2 Protein Degradation *. v. 290, n. 11, p. 7234–7246, 2015.

O'SULLIVAN, O. et al. Exercise and the microbiota. **Gut Microbes**, v. 6, n. 2, p. 131–136, 2015.

OLIVEIRA, A. G. et al. Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. **Diabetes**, v. 60, n. 3, p. 784–796, 2011.

OLIVEIRA, C. R. et al. Myelopoiesis modulation by ACE hyperfunction in kinin B1 receptor knockout mice: Relationship with AcSDKP levels. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, n. 3, p. 388–395, 2010.

PACKER, N.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise Training Reduces Infl ammatory Mediators in the Intestinal Tract of Healthy Older Adult Mice *. v. 1, n. 2, p. 161–171, 2012.

PERVAIZ, N.; GUAN, J. Voluntary exercise training in mice increases the expression of antioxidant enzymes and decreases the expression of TNF- a in intestinal lymphocytes. **Brain Behavior and Immunity**, v. 23, n. 4, p. 498–506, 2009.

PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. p. 1154–1162, 2005a.

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

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 3, p. 141–53, 2014.

PORITZ, L. S. et al. Increase in the Tight Junction Protein Claudin-1 in Intestinal Inflammation. p. 2802–2809, 2011.

RAKOFF-NAHOUM, S. et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. **Cell**, v. 118, n. 2, p. 229–241, 2004.

RIZK, P.; BARKER, N. Gut stem cells in tissue renewal and disease : methods , markers , and myths. v. 4, n. October, p. 475–496, 2012.

SAFDAR, A.; SALEEM, A.; TARNOPOLSKY, M. A. The potential of endurance exercise-derived exosomes to treat metabolic diseases. **Nature Publishing Group**, n. May, 2016.

SALZMAN, N. H.; UNDERWOOD, M. A.; BEVINS, C. L. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 2, p. 70–83, 2007.

SATTLER, S. et al. IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (Breg IL-33) effectively attenuate mucosal in fl ammatory responses in the gut q. v. 50, p. 107–122, 2014.

SHEN, L. et al. HHS Public Access. n. 4, p. 283–309, 2015.

SIMPSON, R. J. et al. **Exercise and the aging immune systemAgeing Research Reviews**, 2012.

SONNENBERG, G. F.; FOUSER, L. A; ARTIS, D. Border patrol: regulation of immunity,

inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. **Nature immunology**, v. 12, n. 5, p. 383–90, 2011.

SUKHOTNIK, I. et al. Oral insulin up-regulates Toll-like receptor 4 expression and enhances intestinal recovery following lipopolysaccharide-induced gut injury in a rat. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 53, n. 5, p. 1231–1239, 2008.

ULLUWISHEWA, D. et al. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. **The Journal of nutrition**, v. 141, n. 5, p. 769–776, 2011a.

ULLUWISHEWA, D. et al. Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components 1 , 2. n. C, p. 1–8, 2011b.

VELLOSO, L. A; FOLLI, F.; SAAD, M. J. TLR4 at the crossroads of nutrients, gut microbiota and metabolic inflammation. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 3, p. 245–271, 2015.

WANG, J. et al. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. **The ISME journal**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2015.

WANG, Y. et al. Both the anti- and pro-apoptotic functions of villin regulate cell turnover and intestinal homeostasis. **Nature Publishing Group**, n. October, p. 1–10, 2016.

WELLS, J. M. et al. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108 Suppl, p. 4607–4614, 2011.

WIJCK, K. VAN et al. Exercise-Induced Splanchnic Hypoperfusion Results in Gut Dysfunction in Healthy Men. v. 6, n. 7, 2011.

WILLIAMS, J. M. et al. A mouse model of pathological small intestinal epithelial cell

apoptosis and shedding induced by systemic administration of lipopolysaccharide. v. 1399, p. 1388–1399, 2013.

WILLIAMS, J. M. et al. Epithelial Cell Shedding and Barrier Function : A Matter of Life and Death at the Small Intestinal Villus Tip. v. 52, n. 3, p. 445–455, 2015.

XU, X. et al. Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. v. 20, n. 12, p. 3255–3264, 2014.

YANG, H. et al. Energy metabolism in intestinal epithelial cells during maturation along the crypt-villus axis. **Nature Publishing Group**, p. 1–13, 2016.

YASUMATSU, H.; TANABE, S. The casein peptide Asn-Pro-Trp-Asp-Gln enforces the intestinal tight junction partly by increasing occludin expression in Caco-2 cells. n. 2010, p. 951–956, 2017.

YUE, C. et al. Lipopolysaccharide-induced bacterial translocation is intestine site-specific and associates with intestinal mucosal inflammation. **Inflammation**, v. 35, n. 6, p. 1880–1888, 2012.