A low-angle, slow-motion photograph of a person's legs and feet as they run on a gravel path. The sun is low on the horizon, creating a strong lens flare and casting long shadows. The person is wearing a white t-shirt, dark shorts, and colorful running shoes. The background is a clear sky and some distant trees.

Cintia Tóquio Reis Gonçalves

**Efeitos do exercício físico aeróbico na lesão pulmonar aguda
induzida por lipopolissacarídeo em camundongos**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa: Patologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Marisa Dolhnikoff

**São Paulo
2012**

Cintia Tóquio Reis Gonçalves

Efeitos do exercício físico aeróbico na lesão pulmonar aguda
induzida por lipopolissacarídeo em camundongos.

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa: Patologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Marisa Dolhnikoff

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gonçalves, Cintia Tócio Reis

Efeitos do exercício aeróbico na lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo em camundongos / Cintia Tócio Reis Gonçalves. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientadora: Marisa Dolhnikoff.

Descritores: 1.Exercício 2.Exercício aeróbico 3.Lesão pulmonar aguda
4.Lipopolissacarídeos

USP/FM/DBD-034/12

A Aquele que era e que É, e que há de vir...

Jesus...

Aos meus queridos filhos Pedro e Felipe cujos
sorrisos são a minha força motriz...

Ao meu marido Carlos Gustavo, meu amor, amigo,
companheiro e bagunceiro... tudo junto e
misturado.

Agradecimentos:

Gostaria de agradecer com muita alegria, às pessoas tão especiais que contribuíram e foram, na verdade, imprescindíveis para a realização desta pesquisa.

À minha querida orientadora Marisa Dolhnikoff, uma mulher generosa direcionada pelo Senhor para me ajudar, ensinar e compartilhar seu profundo conhecimento comigo. Sinto-me imensamente feliz e honrada por ter sido sua aluna.

Aos meus queridos amigos Rodolfo e Rosa a quem agradeço aqui na terra pela oportunidade de estar na USP trilhando o caminho da pesquisa. Além disso, agradeço pelo apoio espiritual e científico que recebi de vocês.

Ao meu marido Carlos Gustavo, que com sua alegria, sua forma de enxergar as coisas, fez com que meus dias de luta fossem mais divertidos, prazerosos e inesquecíveis... Sei que sem você não teria conseguido...

Quero fazer um agradecimento especial ao Prof. Dr. Raymundo Soares de Azevedo que tão carinhosamente cuidou e direcionou questões burocráticas do meu doutorado.

À querida Prof^a. Dr^a. Elia Caldini pela ajuda nos momentos especiais.

Ao Prof. Dr. Paulo Saldiva (pepino) sempre enchendo de alegria os lugares por onde passa.

Ao querido professor Hugo Caire Castro Faria Neto (FIOCRUZ), pela alegria, o incentivo e ajuda sempre presente.

Aos meus queridos pastores: Sérgio e Glória que sempre me aconselharam com entusiasmo, Amauri e Adriana que compartilharam comigo vários momentos da caminhada, Fábio e Dani que direcionados por Jesus, proporcionaram um dos momentos mais importantes da minha vida...

À pastora Denise Lopes, um anjo do Senhor, que me acolheu, me ouviu e me levou aos braços do Pai, quando mais precisei...

Agradeço de coração à minha sogra Maria Aparecida e minha cunhada Glauci Elissa pelo cuidado com meus filhos quando precisei estar distante.

Aos queridos amigos da Bola de Neve: Olavo e Helena, Cris, Patricia Sturnick, Rodrigo Martin, Helen e Saimon, Sandra, Riva e Nil, Suellen e Paulo, Pedro Albuquerque, Giovani, Camila e Didi.

Aos queridos primos e amigos Bruna e Igor, pela amizade construída em tão curto período e que tem sido tão especial em minha vida.

Aos primos Guto Oliveira e Gabriela Oliveira pela ajuda em momentos importantes.

Aos queridos funcionários da FMUSP que me ajudaram sempre tão prontamente: Ângela querida (imunohistoquímica), Celina e Kelly (histologia), Dalvinha, Reginaldo, Ana, Iris, Zilá, Nildo, Rosana, Davi, Thiago... Vocês estão no meu coração.

Aos queridos amigos do laboratório que me ajudaram tanto... Francine, Fernanda Lopes, Clarice, Fernanda Arantes, Bia, Ronaldo, Edna, Ana Júlia, Dra. Adenir, a querida Taty Lanças e Afonso.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz, à Profa. Dra. Thais Mauad sempre tão simpáticos e tão prontos a ajudar...

À minha irmã Fabiana e minha avó Maria Emiliana por tudo...

Ao meu pai Mário Tóquio e minha mãe Elidia Pereira por me darem a vida e me estimularem a buscar algo melhor...

“Senhor...

Há algo especial no ar, existe um louvor em meu coração neste dia.

Quero te agradecer com todo o meu ser pelo tão grande amor. Pelos momentos que me envolve com Sua presença e Seu Espírito e, porque não, pelas dificuldades que permitiu para edificar meu caráter.

Cresci... E este gradativo crescimento aconteceu como fruto de Suas mãos...

O Senhor sabe que esta tese se trata de um sonho que um dia foi tão distante, que somente o ato de imaginar era considerado uma loucura... Mas o Senhor é o Deus do impossível que abre as portas do céu, move tudo o que é necessário para satisfazer os desejos do coração dos seus filhos...

Querido Jesus, o Senhor é tão maravilhoso, conhece tão profundamente os meus sonhos em cada detalhe, que talvez nem eu mesma os conheça... Seu amor é tão lindo e infalível, que me estimula a cada dia a buscar mais e mais a Sua face e querer estar perto de Ti...

Neste dia, tenho tanto a Te agradecer, que palavras são irrisórias pelos Seus grandes feitos, mas sei que o Senhor está muito feliz, porque meu coração transborda de alegria.

Papai, muito obrigado! Quero hoje que meu louvor ecoe por todo universo, e a minha gratidão seja aceita em Sua presença. E em especial quero entrelaçar as minhas mãos em Suas mãos e pedir que continue a caminhar comigo por toda a vida.

Te amo Jesus!!!!”

*“Não pergunte do que o mundo precisa.
Pergunte o que o faz sentir-se vivo e
corra atrás disso. Porque o mundo
precisa de pessoas que tenham vida.”*

Howard Thurman

Sumário

Lista de Abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

RESUMO

SUMMARY

1.0-Introdução:	1
1.1- SARA – Definição	2
1.3- Patogênese	4
1.3.1- Lesão do endotélio pulmonar	5
1.3.2- Lesão do epitélio alveolar na lesão pulmonar aguda	8
1.3.3- Mediadores inflamatórios na SARA	12
1.4- SARA/LPA: o desafio dos modelos experimentais	19
1.5- O modelo de LPA induzida por LPS	24
1.5.1- Mecanismo:	25
1.6 - O papel do exercício físico nas doenças inflamatórias:	26
1.7- Treinamento físico aeróbico	28
2.0- JUSTIFICATIVA	29
3.0- OBJETIVO GERAL	30
3.1- Objetivo específico:	30
4.0- MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1- Animais	31
4.2- Grupos experimentais	31
4.3- Protocolo de teste e treinamento físico	32
4. 4- Indução da lesão pulmonar aguda	33
4.5- Avaliação da mecânica pulmonar	33

4.6- Coleta e análise do óxido nítrico exalado.....	34
4.7- Coleta e análise do sangue.....	34
4.8- Coleta e análise do lavado broncoalveolar (LBA).....	34
4.9- Análise dos níveis de citocinas nos pulmões e no soro	35
4.10- Extravasamento de proteína	36
4.11- Histologia e morfometria pulmonar	36
4.12- Determinação da atividade da glutathione peroxidase (GPX).....	37
4.13- Determinação da atividade de glutathione reductase (GR).....	39
4.14- Determinação da glutathione S-transferase (GST).....	41
4.14.1- Determinação da concentração de proteínas	42
4.15 - Determinação da atividade da catalase (CAT)	42
4.16 - Determinação da atividade da cu/znsOD.....	44
4.17- Quantificação do malonaldeído (MDA).....	45
4.18 - Análise estatística	46
5.0 – RESULTADOS	48
5.2- Testes de capacidade máxima	48
5.3 - Mecânica respiratória	49
5.4 - Concentração de NO exalado.....	51
5.5 - Extravasamento de proteína no LBA	53
5.6 - Contagem celular no LBA.....	53
5.7- Citocinas no soro	54
5.8- Citocinas no LBA	55
5.9- Polimorfonucleares no tecido pulmonar.....	56
5.10 - Expressão de citocinas no tecido pulmonar.....	59
5.11- Atividades enzimáticas no tecido pulmonar.....	64
5.12- Expressão de SOD no tecido pulmonar.....	67
5.13 - Expressão de receptores de glicocorticóide no tecido pulmonar.....	69

5.14- Correlações	71
6.0- DISCUSSÃO.....	72
7.0- CONCLUSÃO	83
8.0- BIBLIOGRAFIA.....	84

Lista de Abreviaturas, símbolos e siglas

SARA	Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
TLR4	Toll Like Receptor 4 (em inglês)
Nets	Neutrophil Extracellular Traps (em inglês)
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PAF	Fator de Ativação Plaquetário
PMN	Polimorfonucleares
MIF	Fator de Inibição de Migração de Macrófagos
TNF	Fator de Necrose Tumoral
LPS	Lipopolissacarídeo
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8

EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
O_2^-	Ânion Superóxido
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
NO	Óxido Nítrico
MPO	Mieloperoxidase
CAT	Catalase
SOD	Superóxido Dismutase
GPX	Glutathione Peroxidase
GST	Glutathione S Transferase
MEC	Matriz Extracelular
DAD	Dano Alveolar Difuso
ATS	American Thoracic Society (em inglês)
IgM	Imunoglobulina M
cmH ₂ O	Centímetros de água
mmHg	Milímetros de Mercúrio
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor (em inglês)
ENA-78	Epithelial Neutrophil-Activating Peptide (em inglês)
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1 (em inglês)

LBA	Lavado Broncoalveolar
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
IL-1ra	Receptor antagonista de IL-1
STNF-R	Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor (em inglês)
Th ₂	T helper cell (em inglês)
CAPesq	Comissão de Ética e Pesquisa
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CTR	Controle
Exe	Exercício aeróbico
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
cm	Centímetro
mg	Miligrama
PEEP	Positive end expiratory pressure (em inglês)
Raw	Resistência das vias aéreas
Law	Inertância das vias aéreas
Gtis	Resistência do tecido pulmonar
Htis	Elastância do tecido pulmonar
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão

rpm	Rotações por minuto
NaCl	Cloreto de Sódio
ul	Microlitros
Gre	Receptor de glicocorticóide
GSSG	Glutationa oxidada
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfatada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GSH	Glutationa reduzida
k:	Inclinação de curva de decaimento
b:	Caminho óptico
$\xi H 2 O 2$.	$3,94 \times 10^{-3}$
Cu	Cobre
Zn	Zinco
Hb	Hemoglobina
MDA	Malonaldeído
TBA	Ácido tiobarbitúrico
BHT	hidroxitolueno butilado
DP	Desvio padrão
IIQ	Interquartil

Km/h	Kilômetros por hora
ns	Não significativo
R	Valores de correlação
p	Significância
α	Alfa
β	Beta
KC	Homólogo de IL-8
HPA	Eixo hipotálamo - hipófise – adrenal
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
TCDF	Tribunal de Contas do Distrito Federal
R\$	Reais

Lista de Figuras

<i>Figura 1-</i> Alvéolo normal e lesão alveolar na fase aguda da LPA e SARA	5
<i>Figura 2-</i> Formação dos Nets.....	8
<i>Figura 3-</i> Migração neutrofílica através do epitélio pulmonar	11
<i>Figura 4 -</i> Critérios para obtenção de um modelo animal de LPA.	24
<i>Figura 5-</i> Valores de elastância pulmonar.	50
<i>Figura 6-</i> Valores de resistência pulmonar	51
<i>Figura 7.</i> Valores de óxido nítrico exalado	52
<i>Figura 8-</i> Densidade de neutrófilos no tecido pulmonar.....	57
<i>Figura 9-</i> Fotomicrografia digital de tecidos pulmonares de camundongos. Diferentes densidades de polimorfonucleares nos quatro grupos.	58
<i>Figura 10 -</i> Expressão de IL- 6 no tecido pulmonar	60
<i>Figura 11-</i> Fotomicrografia digital de tecidos pulmonares de camundongos demonstrando as células positivas para IL-6.....	61
<i>Figura 12-</i> Expressão de IL- 10 no tecido pulmonar.	62
<i>Figura 13-</i> Fotomicrografia digital de tecidos pulmonares de camundongos demonstrando as células positivas para IL-10.....	63
<i>Figura 14–</i> Atividade enzimática de GPX no tecido pulmonar	65
<i>Figura 15-</i> Atividade enzimática de GR no tecido pulmonar	66
<i>Figura 16 -</i> Expressão de SOD no tecido pulmonar	68
<i>Figura 17-</i> Expressão de Gre no tecido pulmonar.	70

Lista de Tabelas

Tabela 1- Contagem de células totais e diferenciais no lavado broncoalveolar.....	54
Tabela 2- Níveis de citocinas no soro	55
Tabela 3 - Níveis de citocinas no LBA	56
Tabela 4 - Correlações entre os níveis de citocinas e células inflamatórias em animais que receberam LPS	71

Gonçalves CTR. *Efeitos do exercício físico aeróbico na lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo em camundongos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

RESUMO

Introdução: A prática regular de exercício tem sido grandemente associada a efeitos benéficos em doenças pulmonares crônicas como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica. Poucos estudos têm avaliado os benefícios do exercício aeróbico na lesão pulmonar aguda (LPA). **Objetivo:** Neste estudo nós investigamos os mecanismos envolvidos no papel do exercício físico em diminuir os danos pulmonares causados pela LPA induzida por lipopolissacarídeo (LPS). **Métodos:** Camundongos Balb/c foram divididos em quatro grupos: Controle (CTR), Exercício (Exe), LPS e Exercício+LPS (Exe+LPS). Os animais dos grupos Exe e Exe+LPS foram treinados em baixa intensidade por 60 minutos/dia, 3x/semana, durante 5 semanas. A instilação intratraqueal de LPS (200 µ/animal) foi realizada 48 horas após o último teste físico nos grupos LPS e Exe+LPS. Vinte e quatro horas após a instilação de LPS nós analisamos os níveis de óxido nítrico exalado (NO), a mecânica respiratória e a densidade de neutrófilos no tecido pulmonar. Nós analisamos também os níveis de extravasamento de proteína, contagem de células totais e diferenciais e os níveis de IL-1 β , IL-6, KC, IL-10 and TNF- α no lavado bronco-alveolar (LBA). Os níveis de IL-6 e IL-10 também foram avaliados no plasma e tecido pulmonar. A expressão de receptores de glicocorticóide (Gre) e da enzima superóxido dismutase (SOD) foi analisada no tecido pulmonar. As atividades enzimáticas de glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), e SOD foram determinadas no homogenato de pulmão por espectrofotometria. O nível de malonaldeído (MDA) foi quantificado no homogenato de

pulmão. **Resultados:** A instilação de LPS resultou em aumento nos níveis de NO exalado ($p<0,01$), aumento do número de células e neutrófilos no LBA ($p<0,001$), aumento do número de neutrófilos no parênquima pulmonar ($p<0,001$), aumento dos valores de resistência e elastância pulmonar ($p=0,01$), aumento dos níveis de extravasamento de proteína ($p\leq 0,02$), aumento dos níveis de IL-6 e IL-10 no plasma ($p<0,02$) e aumento dos níveis de IL-1 β , IL-6 e KC no LBA ($p\leq 0,005$), comparado ao grupo CTR. O exercício aeróbico (grupo Exe+LPS) diminuiu significativamente os níveis de NO exalado ($p=0,006$), a densidade de neutrófilos no parênquima pulmonar ($p=0,004$), os valores de resistência e elastância pulmonar ($p = 0,003$), aumentou a expressão de IL-6, IL-10 e Gre no tecido pulmonar ($p\leq 0,04$) e aumentou o nível de IL-1 β no LBA ($p=0,04$) comparado ao grupo LPS. **Conclusão:** Nossos resultados mostram que o exercício desenvolve um importante papel em proteger o pulmão dos efeitos inflamatórios da LPA induzida por LPS. Os efeitos do exercício são principalmente mediados pelo aumento da expressão de citocinas antiinflamatórias, sugerindo que o exercício aeróbico pode modular o balanço inflamatório, antiinflamatório na fase inicial na SARA.

Descritores: exercício aeróbico, exercício, lesão pulmonar aguda, lipopolissacarídeos.

Gonçalves CTR. *Effect of aerobic exercise on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

SUMMARY

Background: The regular practice of exercise has been increasingly associated to benefic effects on chronic pulmonary conditions such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Few studies have also reported the effects of aerobic exercise on acute lung injury (ALI). **Objective:** In this study we investigated the mechanisms involved in the role of exercise in attenuating the pulmonary changes in a model of lipopolysaccharide (LPS)-induced ALI. **Methods:** BALB/c mice were divided into four groups: Control (CTR), Exercise (Exe), LPS, and Exercise + LPS (Exe+LPS). Mice from Exe and Exe+LPS groups were trained at low intensity exercise for 60 minutes/day, 3 days/week, during 5 weeks. Intratracheal instillation of LPS (200 μ /mouse) was performed 48 hours after the last physical test in the LPS and Exe+LPS groups. Twenty-four hours after LPS instillation we measured exhaled nitric oxide (NO), respiratory mechanics, and the density of neutrophils in lung tissue. We further analyzed protein leakage, total and differential cell counts and the levels of IL-1 β , IL-6, KC, IL-10 and TNF- α in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). IL-6 and IL-10 levels were also evaluated in serum and lung tissue. The expression of glucocorticoid receptors (Gre) and superoxide dismutase (SOD) was analyzed in lung tissue. Enzymatic activity of glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and SOD was determined in lung homogenates by spectrophotometry. The level of malondialdehyde (MDA) was quantified in lung homogenates. **Results:** LPS instillation resulted in increased levels of exhaled NO ($p<0.01$), higher number of

total cells and neutrophils in the BALF ($p < 0.001$), higher number of neutrophils in the lung parenchyma ($p < 0.001$), higher values of pulmonary resistance and elastance ($p = 0.01$), increase of protein leakage ($p \leq 0.02$), increase of IL-6 and IL-10 level in serum ($p < 0.02$) and increase in IL-1 β , IL-6 and KC levels in BALF ($p \leq 0.005$), compared to the CTR group. Aerobic exercise (Exe+LPS group) resulted in significantly lower exhaled NO levels ($p = 0.006$), lower density of neutrophils in the lung parenchyma ($p = 0.004$), lower pulmonary resistance and elastance values ($p = 0.003$), increased expression of IL-6, IL-10 and Gre in lung tissue ($p \leq 0.04$) and increased IL-1 β level in BALF ($p = 0.04$) compared to the LPS group. **Conclusion:** Our results show that exercise plays an important role in protecting the lung from the inflammatory effects of LPS-induced ALI. The effects of exercise are mainly mediated by the increased expression of anti-inflammatory cytokines, suggesting that aerobic preconditioning can modulate the inflammatory-anti-inflammatory balance in the early phase of ARDS.

Key words: exercise, aerobic exercise, acute lung injury, lipopolysaccharides.

1.0-Introdução:

Em 1967, Ashbaugh e colaboradores publicaram a primeira descrição de casos de pacientes com a Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA). Após quarenta e cinco anos e mais de 1200 citações deste estudo, a SARA e sua forma mais branda, a Lesão Pulmonar Aguda (LPA) permanecem como importantes causas de morbidade, mortalidade e altos custos para a saúde, além de representarem um grande desafio terapêutico para a medicina intensiva (Lam, Santos, 2008).

A necessidade de novos recursos para o tratamento da SARA, tem resultado em um grande número de estudos que visam revisar a epidemiologia básica da síndrome. O maior desafio da doença, tem sido a compreensão dos diversos mecanismos envolvidos no intenso processo inflamatório sistêmico presente na síndrome, além dos conseqüentes efeitos incapacitantes a longo prazo.

A expectativa de médicos e pesquisadores é que o profundo entendimento da fisiopatologia da síndrome, associado aos avanços tecnológicos, possam produzir resultados promissores, que viabilizem melhores prognósticos a todos os pacientes que desenvolvam SARA.

Corroborando com esta nova perspectiva, a crescente evidência de que a adoção de hábitos de vida saudáveis, entre eles a prática de atividade física regular, reduz a morbi-mortalidade de diversas doenças, tem despertado o interesse dos pesquisadores em compreender os mecanismos responsáveis por esses benefícios.

Ainda que saibamos que não se previne SARA, este trabalho buscou enfatizar o aspecto preventivo que a prática habitual da atividade física pode propiciar no tocante à intensidade da resposta imunológica do indivíduo frente à síndrome.

As relevantes informações encontradas, do ponto de vista fisiopatológico, além de motivarem a realização de novas pesquisas, demonstram o caráter de saúde pública deste estudo, visando o bem estar da população.

1.1- SARA – Definição

O termo SARA descreve o conjunto de achados clínicos de início agudo, incluindo hipoxemia arterial progressiva e grave, infiltrado pulmonar bilateral, dispnéia, aumento importante do trabalho respiratório, edema pulmonar não cardiogênico, secundários a uma etiologia conhecida como: sepsis, pneumonia, aspiração de conteúdo gástrico e traumas (Lam, Santos, 2008; Pelosi, 2008; Matthay, Zemans, 2011).

Em 1994, a Conferência Européia-Americana de Consenso estabeleceu que os valores da hipoxemia na SARA correspondem à relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$, e a pressão de oclusão da artéria pulmonar ≤ 18 mmHg. Nesta mesma conferência, foi criado o termo lesão pulmonar aguda (LPA) cuja definição muito se assemelha a SARA, exceto pelo grau menos acentuado de hipoxemia ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$). Assim, todo paciente com SARA apresentou LPA, porém nem todo paciente com LPA evolui para SARA (Amato et al., 2007; Raghavendran, Napolitano, 2011).

1.2- Patologia

As características patológicas dos pulmões de pacientes acometidos pela SARA foram descritos em um estudo clássico de 1977 que incluem detalhes ultra-estruturais em diferentes fases da doença (aguda, subaguda e crônica) (Matthay, Zemans, 2011).

A SARA pode ser dividida em três fases, sendo cada fase variável de acordo com o tempo e a evolução clínica da doença: a “fase exsudativa”, de edema e hemorragia, a “fase proliferativa”, de organização e reparação, e a “fase de fibrose” (Antoniazzi et al., 1998). Essa divisão do quadro clínico-patológico em três fases apresenta um caráter didático, sendo essas alterações superponíveis e heterogêneas. Vários estudos mostram que a sinalização para o desenvolvimento de fibrose pode ocorrer muito precocemente, nas primeiras horas de doença (Martin et al., 1995).

Na fase aguda ou exsudativa (1- 6 dias) existe a evidência de edema intersticial e alveolar com acúmulo de neutrófilos, macrófagos e hemácias no alvéolo. Além disso, há evidência de lesão endotelial e epitelial geralmente com desnudação do epitélio alveolar. Esta fase se caracteriza pela presença de membranas hialinas nos alvéolos (Antoniazzi et al., 1998; Matthay, Zemans, 2011). Na fase subaguda ou proliferativa (7-14 dias) certa quantidade de edema pode ter sido reabsorvida e há evidências da tentativa de reparo com a proliferação das células epiteliais do tipo II. Ocorre a infiltração de fibroblastos e deposição de colágeno (Antoniazzi et al., 1998; Matthay, Zemans, 2011). Na fase crônica ou de fibrose (em geral após 14 dias), ocorre a remissão do infiltrado neutrofílico agudo, com maior presença de células mononucleares, macrófagos alveolares e manutenção do reparo

do epitélio alveolar. Nesta fase, freqüentemente ocorre a fibrose. Em alguns casos pode haver uma remissão simples e gradual do edema e da inflamação aguda, não ocorrendo a fase de fibrose (Antoniuzzi et al., 1998; Matthay, Zemans, 2011).

1.3- Patogênese

Na patogênese da SARA destacam-se:

- ❖ Os fatores responsáveis pelo acúmulo de exsudato e edema neutrofílico no interstício pulmonar e no espaço aéreo pulmonar distal;
- ❖ Os mecanismos que prejudicam a remoção do edema e células inflamatórias pulmonares.

O edema na SARA está associado com o grande número de neutrófilos, monócitos, células epiteliais desnudadas e marcadores pró-inflamatórios como: citocinas, proteases, oxidantes e fatores pró-coagulantes (Figura 1) (Matthay, Zemans, 2011).

Figura 1- Alvéolo normal (painel esquerdo) e lesão alveolar na fase aguda da lesão pulmonar aguda (LPA) e Síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) (painel direito) (Matthay; Zemans, 2011).

1.3.1- Lesão do endotélio pulmonar

As células endoteliais constituem uma barreira importante entre o sangue e o espaço extracelular. Respondem também pela síntese e secreção de moléculas que desempenham importantes papéis fisiológicos, influenciando a integridade funcional e estrutural da circulação. Possuem várias funções biológicas, como propriedades

pró-coagulantes, antiplaquetárias, anticoagulantes, fibrinolíticas e metabólicas. Além disso, regulam o tônus vascular, mantendo o fluxo sanguíneo, a resposta inflamatória e imunológica (Salles et al., 1999).

A lesão do endotélio pulmonar associada à lesão do epitélio alveolar são os fatores desencadeantes da SARA/LPA. Existem consideráveis evidências de que o aumento da permeabilidade vascular ocorre primeiramente na microcirculação pulmonar, resultando no acúmulo de exsudato dentro do alvéolo. A lesão do endotélio pode ocorrer por diversos mecanismos, sendo a via neutrofílica a mais ressaltada (Matthay, Zemans, 2011).

Em muitos modelos experimentais, a principal via utilizada para induzir lesão pulmonar é a neutrofílica. Nestes modelos, a lesão pulmonar, infecciosa ou não, é gerada pela degranulação dos neutrófilos acumulados e ativados nas regiões microvasculares do pulmão, levando à liberação de mediadores tóxicos como: proteases, espécies reativas de oxigênio, citocinas pró-inflamatórias e moléculas pró-coagulantes que resultam em aumento da permeabilidade vascular e perda funcional da barreira endotelial (Barbas, Amato, Carvalho, 2007; Matthay, Zemans, 2011).

Estudos recentes demonstram que as plaquetas podem desenvolver uma ação sinérgica em conjunto com os neutrófilos, causando lesão endotelial. As plaquetas interagem diretamente com neutrófilos e monócitos estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias. Em estudos experimentais de LPA por transfusão sanguínea, a depleção de plaquetas reduziu notoriamente a lesão pulmonar em camundongos (Matthay, Zemans, 2011).

A via mediadora da interação entre plaquetas e neutrófilos durante a lesão pulmonar ainda é pouco conhecida. O recrutamento neutrofílico é mediado passo a passo pelas interações com o endotélio, usualmente denominadas “adesão por rolamento” (Matthay, Zemans, 2011). A hipótese é que uma vez detectado o LPS no sangue, ocorra uma sinalização via Toll-like-receptor 4 (TLR4) induzindo à ligação plaqueta-neutrófilo, ativando o endotélio. As plaquetas estimulariam os neutrófilos ativados levando à formação dos “Neutrophil Extracellular Traps” (Nets) que funcionam como uma “armadilha” para captura das bactérias (Figura 2) (Ma, Kubes, 2008).

Além do efeito dos neutrófilos, alguns mediadores inflamatórios atuam diretamente no endotélio pulmonar resultando no aumento da expressão de quimiocinas bem como no aumento da adesão de leucócitos nas membranas celulares.

O aumento do recrutamento de neutrófilos e da adesão de leucócitos no endotélio pulmonar além de causar lesão, promove a atração de outros leucócitos para o pulmão. Esta é a principal hipótese da patogênese da lesão endotelial na lesão pulmonar aguda (Matthay, Zemans, 2011).

Figura 2- (a) Neutrófilos e plaquetas circulando nos capilares. A presença de *E. coli* leva à ativação de TLR4. (b) Neutrófilos detectam o LPS e são recrutados para o endotélio capilar. Plaquetas ativadas pelo TLR4 são atraídas para os neutrófilos aderentes, onde se acoplam imobilizando os neutrófilos. (c) Formação de uma potente ativação neutrofílica e formação dos Nets (MA; KUBES, 2008).

1.3.2- Lesão do epitélio alveolar na lesão pulmonar aguda

O epitélio pulmonar é o foco central na patogênese e reparo na SARA. A principal função desta barreira é regular a entrada de água e solutos para o surfactante,

elemento responsável pela manutenção da interface líquido-ar que evita o colapamento alveolar (Gropper, Kronish, 2008).

Embora a lesão do endotélio pulmonar seja pré-requisito para o desenvolvimento do edema exsudativo na SARA, isoladamente ela é insuficiente para causar a síndrome, sendo necessária a lesão do epitélio pulmonar. O mecanismo responsável pela lesão epitelial na SARA parece ser a presença de neutrófilos e seus produtos.

Normalmente, neutrófilos atravessam o epitélio alveolar sem aumentar sua permeabilidade. Entretanto, em estados patológicos, a migração de um grande número de neutrófilos, resulta em lesão epitelial. O grau de ativação de neutrófilos pela exposição às quimiocinas e outros estímulos pró-inflamatórios, parecem ter um importante papel no efeito lesivo.

A migração transepitelial de neutrófilos envolve três estágios: adesão, migração e pós-migração (Figura 3).

No primeiro estágio, os neutrófilos aderem à superfície basolateral do epitélio através das integrinas β_2 . Supõe-se que o complexo CD11/CD18 seja o primeiro receptor de superfície envolvido nesta fase. Outro receptor o CD47, presente na superfície das membranas dos neutrófilos e no epitélio alveolar, também parece estar envolvido neste estágio.

Estudos demonstram que bloquear o CD47 dificulta a migração transepitelial pelo neutrófilo. Além disso, camundongos deficientes de CD47 apresentam redução do influxo de neutrófilos e da decorrente permeabilidade alveolar, quando submetidos à inalação de endotoxina (Matthay, Zemans, 2011).

Uma vez que os neutrófilos atravessam o epitélio e adentram ao espaço aéreo, eles se alojam na superfície apical das células epiteliais onde fagocitam e matam as bactérias (Matthay, Zemans, 2011). Em condições fisiológicas, após os neutrófilos atravessarem as junções intercelulares, estas se fecham, mantendo a barreira epitelial íntegra e o espaço aéreo alveolar livre de líquidos. Entretanto, em condições patológicas, o grande número de neutrófilos lesa o epitélio através da liberação de moléculas tóxicas, as quais induzem a dissolução das junções intercelulares, além de causarem apoptose e necrose das células alveolares tipo I e II (Belo, 2002; Matthay, Zemans, 2011).

A célula epitelial tipo I é altamente vulnerável a lesões, entretanto, a tipo II é a célula mais resistente e pode funcionar como progenitora celular para regeneração do epitélio após a lesão (Geiser, 2003).

Figura 3- A migração neutrofílica através do epitélio pode ser dividida em três fases: adesão, migração e pós-migração. A fase inicial da migração transepitelial é caracterizada pela adesão de neutrófilos na membrana basolateral do epitélio alveolar. Após a adesão inicial, os neutrófilos se arrastam entre os espaços epiteliais se acoplando em moléculas de superfície encontradas nas células epiteliais. Após atravessar a monocamada epitelial, os neutrófilos aderem à superfície apical do epitélio onde resistem ao fluxo de fluídos e forças mecânicas, constituindo uma barreira de defesa contra microorganismos invasores (Matthay, Zemans, 2011).

Dentre as moléculas tóxicas temos:

- ❖ Proteases: entre elas a elastase e collagenase que estão diretamente relacionadas à agressão da membrana celular.
- ❖ Espécies reativas de oxigênio: Apresentam importante poder caotrópico, isto é, de alterar a estrutura secundária de proteínas e lipídios presentes na membrana celular, levando à lesão tecidual.

- ❖ Peptídeos catiônicos: como as defensinas, responsáveis por causarem poros entre as células (Barbas, Amato, Carvalho, 2007; Matthay, Zemans, 2011).

A lesão alveolar difusa é a marca dos pacientes com SARA, independente da lesão ter origem intrapulmonar (causa direta) como, por exemplo: pneumonia ou aspiração ácida ou extrapulmonar (causa indireta) como, por exemplo: na sepsis ou no trauma grave (Santos et al., 2006; Browne, Pitchumoni, 2006).

1.3.3- Mediadores inflamatórios na SARA

A resposta inflamatória local é acompanhada por uma resposta sistêmica conhecida como resposta de fase aguda (Petersen, Pedersen, 2005). Estudos experimentais e clínicos têm procurado elucidar os complexos mecanismos envolvidos na patogênese da lesão secundária. Muitos mecanismos permanecem poucos esclarecidos, entretanto, conhecer as funções das citocinas e de outros mediadores inflamatórios, nos ajuda a esclarecer os mecanismos de lesão e reparo na SARA.

A fosfolipase A₂ (PLA₂) tem uma ação importante na remoção de ácidos graxos dos lipídios. Fisiologicamente, a superfície alveolar é recoberta por surfactante que previne o colapso alveolar mantendo a tensão superficial. Um dos mais importantes componentes do surfactante pulmonar é o fosfolipídio dipalmitoil que é um perfeito substrato para a PLA₂. Uma vez que o dipalmitatoil é um substrato para PLA₂, a destruição do surfactante presente na SARA pode ser mediada pela ação da PLA₂ (Geiser, 2003; Malloy, Wright, 2004).

Outro mediador, o fator de ativação plaquetário (PAF), é um mediador biológico potente, cujos efeitos se manifestam em todo o organismo. O PAF estimula as células polimorfonucleares (PMN) regulando a interação destas com as células endoteliais, facilitando a migração e ativação dos leucócitos nos tecidos. O PAF é um componente estrutural da membrana lipídica, liberado através da ação da PLA_2 (Browne, Pitchumoni, 2006).

A liberação de ácidos graxos livres é outra possível causa da lesão pulmonar. Durante o processo inflamatório, a ativação da lipase pulmonar (lipoproteína), libera ácidos graxos e estes (fosfolipídios) têm demonstrado estar relacionados com as lesões das paredes dos capilares alveolares (Browne, Pitchumoni, 2006).

Outro importante mediador pró-inflamatório, o fator inibidor de migração de macrófagos (MIF) é uma citocina produzida por linfócitos T e desenvolve uma função preventiva ao inibir a migração dos macrófagos. A ação reguladora do sistema imunológico apresentada pelo MIF, a qual modula os efeitos antiinflamatórios e imunossupressivos dos glicocorticóides sobre os macrófagos e células T, faz dele uma importante citocina (Browne, Pitchumoni, 2006). Acredita-se que o MIF seja liberado não somente por linfócitos T, mas também por monócitos, macrófagos, células corticotrópicas hipofisárias e células epiteliais. O MIF se mostra elevado em inflamações graves como a sepsis, artrite reumatóide, asma brônquica como também em adultos com SARA (Browne, Pitchumoni, 2006).

As citocinas são proteínas solúveis secretadas por células específicas, que a princípio, possuem a habilidade de modificar o comportamento de outras células (MEDURI et al., 1995). Dentre as citocinas envolvidas na primeira fase da inflamação na SARA destacam-se o $TNF-\alpha$ e as interleucinas 1 e 8 (Meduri et al.,

1995). As duas primeiras citocinas da cascata inflamatória são $\text{TNF-}\alpha$ e a $\text{IL-1 } \beta$, as quais são produzidas no local da inflamação. Essas citocinas são usualmente classificadas como pró-inflamatórias (Petersen, Pedersen, 2005).

O fator de necrose tumoral (TNF) é o principal mediador da resposta inflamatória a bactérias Gram-negativas e também exerce um papel na resposta imune inata a outros microorganismos infecciosos. Originalmente ele foi identificado como um mediador da necrose tumoral estando presente no plasma de animais tratados com LPS. O LPS em baixas concentrações estimula as funções dos fagócitos mononucleares e age como um ativador policlonal de células B, que representam as respostas do hospedeiro para a eliminação de bactérias invasoras. Altas concentrações de LPS causam lesão tecidual, coagulação intravascular disseminada e choque, muitas vezes resultando em morte, sendo o TNF um dos principais mediadores desses efeitos (Abbas et al., 2000).

O $\text{TNF-}\alpha$ tem sido reconhecido como um importante modulador da lesão pulmonar aguda (Yang et al., 2007). Injeções intravenosas de $\text{TNF-}\alpha$ induzem à lesão pulmonar aguda por seqüestro de neutrófilos, congestão vascular e aumento da permeabilidade microvascular (Sakayori, 1992; Browne, Pitchumoni, 2006; Yang et al., 2007). Seus níveis plasmáticos aumentam durante a lesão pulmonar existindo uma correlação direta entre os níveis séricos desta citocina e a gravidade da doença (Meduri et al., 1995).

A função do $\text{TNF-}\alpha$ na SARA pode ser resumida nos seguintes eventos:

- ❖ Na presença da endotoxina, o $\text{TNF-}\alpha$ é liberado por macrófagos ativados;

- ❖ A liberação de TNF- α ativa os neutrófilos, sendo estes os principais responsáveis pelo processo lesivo na SARA;
- ❖ A continuidade da lesão tecidual pulmonar é inibida, uma vez que o TNF- α é inativado na presença da elastase, liberada por polimorfonucleares ativos (Sakayori, 1992).

A IL-1 β é uma citocina modulatória com funções imunes e inflamatórias (JACOBS et al., 1999). Funcionalmente apresenta uma tênue diferença entre benefícios clínicos e toxicidade (Dinarello, 1996). A principal fonte celular de IL-1 é o fagócito mononuclear ativado, assim como do TNF. Esta produção pode ser desencadeada por produtos bacterianos como o LPS, por citocinas derivadas de macrófagos (no caso o TNF), ou pelo contato com as células T CD4+. Tal como o TNF, a IL-1 pode ser encontrada no sangue após septicemia por bactérias Gram-negativas, podendo atuar como hormônio endócrino. Neste caso a IL-1 é produzida em resposta ao TNF (Abbas et al., 2000).

Existem duas formas principais de IL-1, designadas IL-1 α e IL-1 β (Dinarello, 1996). Ambas se ligam aos mesmos receptores de superfície celular e suas atividades biológicas são essencialmente idênticas (Abbas et al., 2000; Weber et al. 2010).

Os efeitos biológicos da IL-1, semelhantes aos do TNF, dependem da quantidade de citocina liberada. Em baixas concentrações, sua principal função é mediar a inflamação local. Por exemplo, a IL-1 age sobre as células endoteliais para promover coagulação e aumentar a expressão de moléculas de superfície que medeiam a adesão leucocitária. A IL-1 não ativa diretamente os leucócitos

inflamatórios, porém faz com que os fagócitos mononucleares e as células endoteliais sintetizem quimiocinas que ativam os leucócitos (Abbas et al., 2000).

A IL-1 quando secretada em maiores quantidades, entra na corrente sanguínea e exerce efeitos endócrinos. A IL-1 sistêmica, compartilha com o TNF a capacidade de provocar febre, de induzir a síntese de proteínas plasmáticas de fase aguda pelo fígado e de iniciar a caquexia (Abbas et al., 2000).

Embora o mecanismo do aumento de IL-1 β não esteja esclarecido, macrófagos alveolares, recuperados de pacientes com SARA e mantidos em cultura, secretam mais IL-1 β que macrófagos de indivíduos sem a presença de SARA (Faust-Chan et al., 1999).

A interleucina 8 (IL-8), além de potente e específico quimiotático para neutrófilos nos pulmões, promove a migração transendotelial, o aumento dos níveis de cálcio intracelular como também a liberação de espécies reativas de oxigênio. Donnely et al. (1993) ao coletarem amostras de lavados broncoalveolares de pacientes que sofreram traumas, demonstraram que os níveis de IL-8 foram significativamente maiores naqueles que desenvolveram SARA.

Espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o óxido nítrico (NO) e a 3-nitrotirosina têm demonstrado importante papel na fisiopatologia da SARA (Tasaka, 2008; Sato et al., 2002). Parte dos efeitos deletérios das EROs e ERNs advém de um efeito direto sobre as células endoteliais, epiteliais e sobre as proteínas de matriz extracelular além do efeito indireto por depletarem os níveis das enzimas antioxidantes (Tasaka, 2008; Sato et al., 2002).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o aumento da produção de EROs e ERNs advém principalmente de neutrófilos e macrófagos ativados via mieloperoxidase (MPO), enzima responsável pela catalização de espécies reativas de oxigênio, assim como do endotélio vascular, do epitélio brônquico e dos pneumócitos (Tasaka, 2008; Sato et al., 2002).

Dentre as diversas EROs e ERNs, destaca-se o óxido nítrico (NO), que é um radical livre, liberado por leucócitos, por células epiteliais e endoteliais e, apresenta inúmeras funções nos pulmões, como broncodilatação e manutenção do tônus da musculatura lisa brônquica, quando em concentrações fisiológicas, mas também apresenta funções pró-inflamatórias, mediando a inflamação, o remodelamento e a hiperresponsividade pulmonar (Petersen, Pedersen; 2005), além de interagir com espécies reativas de oxigênio, formando espécies reativas de nitrogênio altamente deletérias (Tasaka, 2008; Yao et al., 2007; Sugiura, Ichinose, 2008).

Como parte do mecanismo de defesa contra a ação das EROs e ERNs, o organismo dispõe de um complexo sistema de enzimas antioxidantes, composto principalmente pela catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPX) (Lino-dos Santos Franco et al., 2011).

1.3.4. Remissão do edema alveolar e da inflamação

O primeiro passo para que ocorra o reparo pulmonar na SARA, é a remoção do edema alveolar para o interstício pulmonar, onde acontece a *clearance* através dos vasos linfáticos, da microcirculação pulmonar e espaço pleural (Matthay, Zemans, 2011).

A remoção do edema alveolar requer um transporte vetorial de sódio e cloreto através da membrana apical e basolateral das células alveolares tipo I e II, predominantemente pelo canal epitelial de sódio (Gropper, Kronish, 2008; Matthay, Zemans, 2011). O sódio é expelido da célula pela bomba de Na/K-ATP na membrana basolateral, criando um mini gradiente osmótico para a absorção de água de dentro do alvéolo. Acredita-se que o cloreto seja drenado pela rota transcelular, embora seu mecanismo de drenagem não seja completamente conhecido (Gropper, Kronish, 2008; Matthay, Zemans, 2011).

Quando por uma causa cardiogênica, o edema alveolar é facilmente absorvido através do epitélio alveolar. Nos pacientes com LPA a remoção do edema alveolar não pode ser realizada desta forma devido à desnudação do epitélio alveolar ou pela lesão da “maquinaria” de transporte de íons pelo processo inflamatório ou mecanismos oxidantes (Matthay, Zemans, 2011).

A presença de grandes prejuízos do *clearance* alveolar está associada à pior sobrevida em pacientes com SARA. Proteínas solúveis podem ser reabsorvidas para o interstício alveolar através do epitélio pulmonar, já as proteínas insolúveis, tais como os componentes das membranas hialinas, dependem da endocitose, a partir das células epiteliais e da fagocitose pelos macrófagos alveolares para serem retiradas (Galhardo, Martinez, 2003).

A proliferação e diferenciação dos pneumócitos tipo II são de fundamental importância para a regeneração e a recuperação das estruturas alveolares. Entretanto, em alguns casos, por razões desconhecidas, a inflamação progride acompanhada pela infiltração local de miofibroblastos, o que resulta no desenvolvimento de fibrose pulmonar progressiva (Galhardo, Martinez, 2003).

O eficiente reparo do epitélio alveolar pode minimizar a formação da fibrose, pois a camada epitelial intacta suprime a proliferação de fibroblasto e deposição de matriz extracelular (MEC). O reparo epitelial envolve diversos mecanismos moleculares, incluindo a interação entre os pneumócitos tipo II e a MEC (Garcia et al., 2008).

Para a recuperação adequada do epitélio, é necessário que a inflamação seja contida. Alguns estudos têm demonstrado que mediadores lipídicos, denominados lipoxinas e resolvinas podem controlar as respostas inflamatórias locais, através da inibição da ativação de neutrófilos interrompendo assim a inflamação para que ocorra o reparo da lesão pulmonar. A presença de citocinas antiinflamatórias como a IL-10 desenvolve um importante papel na remissão da inflamação pulmonar (Petersen, Pedersen, 2005; Matthay, Zemans, 2011).

1.4- SARA/LPA: o desafio dos modelos experimentais

O que é exatamente a LPA em um animal?

Na literatura mundial não havia um consenso da comunidade científica sobre um modelo estabelecido de LPA em animal. Grande parte desta dificuldade residia no fato de não existir um único parâmetro que tenha sensibilidade ou especificidade suficiente para identificar a ocorrência de todas as formas e gravidades da LPA (Matute-Belo et al, 2011). Tal dificuldade era enfrentada pelos pesquisadores para determinarem, durante um experimento, se havia sido alcançado um modelo de LPA.

Em humanos, a definição de LPA se baseia em parâmetros clínicos, estabelecidos pela Conferência Européia Americana de Consenso. Entretanto, os

critérios adotados pela conferência não podem ser diretamente transferidos para os modelos experimentais (Matthay, Zemans, 2011).

Embora a gasometria arterial, a radiografia de tórax, o ecocardiograma possam ser realizados em pequenos animais, nem todos os laboratórios dispõem desses equipamentos para conduzir a avaliação.

Uma alternativa seria definir a LPA em animais, baseando-se em critérios histopatológicos similares àqueles encontrados em humanos com LPA. Em humanos, a lesão histológica da LPA é o Dano Alveolar Difuso (DAD), caracterizado por infiltrado inflamatório, espessamento dos septos alveolares, exsudato intra-alveolar e deposição de membrana hialina (Matthay, Zemans, 2011; Raghavendran, Napolitano, 2011). Entretanto, nenhum dos modelos animais consegue reproduzir todas as características patológicas do DAD.

Baseado nesta dificuldade, em 2009 foi realizado um workshop pela American Thoracic Society (ATS), com a presença de renomados especialistas em SARA, visando determinar as características principais para que um modelo experimental fosse considerado um modelo de LPA, bem como, estabelecer as formas de obtenção.

Ficou definido que os modelos de LPA devem obedecer aos seguintes critérios:

- ❖ O modelo de LPA em animais deve conter uma ou mais características do modelo humano, incluindo:
 - Início rápido (horas) após o estímulo.
 - Evidência de disfunção fisiológica pulmonar (anormalidades nas trocas gasosas, redução da complacência pulmonar).

- Evidência histológica de lesão do parênquima pulmonar (epitélio, endotélio, interstício).
- Evidência de aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar.
- Resposta inflamatória.

É improvável que qualquer modelo animal englobe todas as características da LPA/SARA humana (Matute-Belo et al., 2011). Porém, de uma forma objetiva, a resposta que todos gostariam de obter é: Quantas características devem conter um modelo animal para ser considerado LPA? A resposta deve levar em consideração muitos fatores, entre eles:

- tipo de animal a ser utilizado,
- tamanho do animal,
- o tipo de lesão a ser induzida (extra ou intrapulmonar),
- a via utilizada para a indução da lesão,
- a intervenção que se pretende avaliar após a lesão,
- o tempo de permanência com a lesão (antes do sacrifício).

Alguns critérios foram adotados para orientação dos pesquisadores.

Cinética da lesão: a lesão máxima pulmonar deve ser evidente dentro de um tempo de 24 horas após o estímulo (Matute-Belo et al., 2011).

Obtenção da radiografia de tórax para caracterizar a lesão: raios-X simples ou tomografia computadorizada apresentando infiltrados bilaterais e difusos

representam um parâmetro para se evidenciar a extensão da lesão. Preferencialmente devem ser utilizados animais de grande porte, como ovelhas, cães, coelhos, porcos.

Acesso à fisiologia da lesão: Microscopia convencional ou fluorescência são técnicas não invasivas que podem ser utilizadas para monitoramento contínuo do capilar ou saturação de oxigênio, evidenciando as alterações fisiológicas (Matute-Belo et al., 2011).

Diminuição da complacência pulmonar: Esse parâmetro pode ser obtido pela ventilação mecânica in vivo ou pela determinação da curva pressão-volume após a manobra de recrutamento alveolar. Devem-se utilizar ventiladores que disponibilizem a automatização da mecânica respiratória ou produzam curvas pressão-volume para determinar a complacência pulmonar (Matute-Belo et al., 2011).

Aumento da permeabilidade alvéolo-capilar: Os métodos utilizados devem mensurar a concentração de albumina ou outra molécula de alto peso molecular como IgM no lavado bronco-alveolar para que seja comparado com a concentração dessas substâncias no plasma (Matute-Belo et al., 2011).

Parâmetros histológicos da lesão pulmonar: A presença de somente um parâmetro histológico no modelo animal, não necessariamente indica um genuíno modelo de LPA e, contrariamente, a ausência de uma ou mais características não exclui ser um modelo de LPA. A respeito dessa divergência, uma obtenção semi-quantitativa ou quantitativa de múltiplas características histológicas é importante para a avaliação da LPA no modelo

animal. Para uma obtenção histológica confiável da lesão, os pulmões devem ser fixados na capacidade residual funcional que pode ser obtida inflando os pulmões com uma pressão de 15-20 cmH₂O (Matute-Belo et al., 2011).

A Figura 4 demonstra um resumo das informações relevantes que um modelo de LPA em animal deve conter, baseado nas conclusões apresentadas no workshop. Para identificar a LPA, os autores recomendam que o modelo possua pelo menos três das quatro “principais características” da lesão. Para determinar se alguma das principais características está presente, os autores recomendam que no mínimo uma das características “muito relevantes” esteja presente, preferencialmente acompanhada de pelo menos uma das características “pouco relevantes” (Matute-Belo et al., 2011).

Figura 4 - Critérios para obtenção de um modelo animal de LPA (Matute-Belo et al., 2011).

1.5- O modelo de LPA induzida por LPS

O LPS é um glicolípídeo presente na membrana externa das bactérias Gram-negativas, composto por um grupo de lipídeos polares em uma das extremidades e uma sequência de dissacarídeos repetidos. No soro, o LPS se acopla a uma proteína ligante específica para o LPS (LBP) formando o complexo LPS:LBP que ativa o complexo CD14/TRL4 nos monócitos, macrófagos e outras células, dando início à produção de mediadores inflamatórios (Matute-Belo et al., 2008).

O LPS é um importante mediador da sepsis desencadeada por bactérias Gram-negativas. Sua administração sistêmica foi um dos métodos pioneiros utilizados como modelo de sepsis bacteriana (Matute-Belo et al., 2008).

1.5.1- Mecanismo:

Após a administração intravenosa de LPS, a lesão se inicia no endotélio capilar. A apoptose parece ser a causa da lesão celular induzida pelo LPS e inicia-se rapidamente após a indução, precedendo outras lesões teciduais (Matute-Belo et al., 2008).

A resposta hemodinâmica é caracterizada por uma fase inicial de leucopenia, decréscimo do débito cardíaco e diminuição da pressão arterial. Ocorre um aumento da pressão arterial pulmonar relacionada ao aumento da resistência nas veias pós-capilares (Matute-Belo et al., 2008).

A fase inicial é seguida por uma lenta melhora na contagem de leucócitos e do perfil hemodinâmico, após 4-6 horas. As alterações pulmonares são evidentes entre 2-4 horas e incluem hipoxemia com aumento da diferença alvéolo-arterial de oxigênio (Matute-Belo et al., 2008).

No pulmão, a administração de LPS por via intravenosa ou intra-alveolar, causa uma deformidade e uma espécie de “armadilha” (Nets) pelos polimorfonucleares nos capilares pulmonares. Conseqüentemente, pequenos números de polimorfonucleares migram para o espaço aéreo alveolar. Os Nets ocorrem antes do aumento da permeabilidade epitelial ou rotura da barreira epitélio-alveolar (Ma, Kubes, 2008).

A administração de LPS por via intratraqueal induz a um grande influxo de polimorfonucleares para o espaço aéreo alveolar e doses em torno de 1-4 ng/Kg causam alterações, caracterizadas por uma fase inicial com aumento de polimorfonucleares, albumina e citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, G-CSF, IL-8, ENA-78, MCP-1, MIP-1 α , e MIP-1 β no LBA e com uma fase tardia (24-48 horas) apresentando normalização das concentrações de citocinas no LBA e aumento de polimorfonucleares no LBA (Matute-Belo et al., 2008).

1.6 - O papel do exercício físico nas doenças inflamatórias:

A prática regular de exercício físico tem sido grandemente associada a efeitos benéficos em doenças pulmonares crônicas como a asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Petersen, Pedersen, 2005; Vieira et al., 2007a, Silva et al., 2010).

Petersen & Pedersen (2005), avaliaram os benefícios do exercício físico em doenças crônicas como arteriosclerose, asma, DPOC e diabetes mellitus. Os autores perceberam que as citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β não aumentam na vigência do exercício físico, concluindo que a cascata de citocina induzida pelo exercício é diferente daquela produzida pela lesão. Outro achado importante, foi que a realização de exercícios induz um aumento dos níveis de citocinas antiinflamatórias circulantes como a IL-10, e dos antagonistas como IL-1ra, e sTNF-R, normalmente secundários à liberação de IL-6 (Malm, 2004; Petersen, Pedersen, 2005).

Utilizando um modelo experimental de asma alérgica, Vieira et al. (2007ab), avaliaram os efeitos antiinflamatórios do exercício de intensidade leve e moderada na inflamação pulmonar crônica induzida pela ovalbumina. Os resultados demonstraram uma diminuição da infiltração eosinofílica na via aérea pulmonar dos dois grupos (leve e moderada intensidade) de exercícios, bem como uma redução da expressão das citocinas pró-inflamatórias Th2 (IL-4 e IL-5). Os autores também observaram que partes destes efeitos poderiam ser mediadas pela expressão aumentada de IL-10.

A IL-10 é uma citocina antiinflamatória que previne a produção de mediadores pró-inflamatórios, em particular de TNF- α por macrófagos e células T. A IL-10 inibe a liberação de IL-6 e IL-1 β como também estimula a síntese do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) e a liberação do receptor de TNF p75, o qual inibe a ação de citocinas pró-inflamatórias. Alguns estudos têm demonstrado que boa parte do aumento da produção de IL-10 durante o exercício ocorre pela ativação dos músculos esqueléticos (Petersen, Pedersen, 2005).

Poucos estudos têm investigado os efeitos do exercício aeróbico na SARA. Em 2008, Mussi et al. mostraram os benefícios do exercício em um modelo de inflamação pulmonar induzida por isquemia-reperfusão. Alguns efeitos do exercício têm sido demonstrados em modelos de inflamação pulmonar induzida por lipopolissacarídeo (LPS). CANNON e KLUGER demonstraram em 1984 que camundongos pré-treinados com corridas e que foram infectados com *Salmonella typhimurium*, apresentaram uma sobrevida significativamente maior do que a observada nos animais sedentários (CANNON, KLUGER, 1984). Recentemente RAMOS et al. (2010) mostraram que o exercício reduziu inflamação neutrofílica e os níveis de NO exalado em camundongos submetidos à instilação nasal de LPS.

1.7- Treinamento físico aeróbico

Uma atividade física é considerada aeróbica quando a maior parte da demanda energética é suprida através do metabolismo aeróbico, normalmente realizada em intensidade de até 70% do consumo máximo de oxigênio (Petersen, Pedersen, 2005; Vieira et al., 2007ab). A atividade física aeróbica realizada de maneira sistemática e regular desencadeia uma série de adaptações crônicas que beneficiam todo o organismo, tais como: redução da pressão arterial e da frequência cardíaca de repouso em indivíduos hipertensos (Petersen, Pedersen, 2005), aumento do consumo máximo de oxigênio, da massa muscular e da densidade óssea (Petersen, Pedersen, 2005), melhora da resposta imunológica (Malm, 2004) e aumento da expressão e atividade das enzimas antioxidantes (Mussi et al., 2008; Rush et al., 2000).

A atividade física aeróbica é capaz de modular tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo (Costa Rosa, 2002; Malm, 2004). Os mecanismos que modulam essas respostas são basicamente dependentes dos efeitos hormonais, metabólicos e mecânicos (Costa Rosa, 2002). Embora o exercício seja normalmente classificado como um estímulo estressante cabe esclarecer que normalmente ocorrem duas respostas ao exercício: a resposta aguda e a adaptação crônica (Costa Rosa, 2002). De acordo com este autor, *“A resposta aguda é reação transitória ao estresse, enquanto o estímulo crônico gera a resposta de adaptação crônica ao exercício, que habilita o organismo a tolerar de maneira mais adequada o estresse”*.

2.0- JUSTIFICATIVA

Embora a literatura não disponha de material elucidativo a respeito dos benefícios do exercício físico na SARA, os mecanismos que envolvem a constante prática da atividade física são bem estabelecidos e demonstram um caráter anti-inflamatório.

O primeiro passo para que ocorra a regeneração na síndrome, é a remissão do processo inflamatório. O reparo epitelial alveolar eficiente, obtido através da remissão precoce do processo inflamatório, pode minimizar a formação de fibrose e seus conseqüentes transtornos. Além disso, a modulação antecipada de uma resposta inflamatória mais eficiente poderia evitar que o sistema imunológico atuasse de forma exacerbada, evitando seqüelas futuras.

Baseado nestas considerações, a hipótese de que a realização prévia da atividade física poderia promover um mecanismo protetor ou modulador de uma resposta imunológica inicial eficiente frente à SARA, foi a motivação deste trabalho.

3.0- OBJETIVO GERAL

Avaliar os mecanismos envolvidos na resposta pulmonar ao exercício físico aeróbico num modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

3.1- Objetivo específico:

Avaliar os efeitos pulmonares da atividade física aeróbica de intensidade leve, realizada por cinco semanas anteriormente à indução experimental de LPA, através da análise de parâmetros inflamatórios, mecânicos e de estresse oxidativo.

4.0- MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental proposto pelo presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CAPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) (aprovação número 0402/08).

4.1- Animais

Foram utilizados 32 camundongos machos da linhagem Balb/c, adultos jovens, com 06 semanas de idade, pesando aproximadamente 15-20 g. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos em condições controladas de temperatura (22-25°C) e luminosidade (ciclo 12h claro/ 12h escuro), e 70 % de umidade relativa. A alimentação constou de água e ração (Purina Labina[®], São Paulo, Brasil) “*ad libitum*” (Vieira, 2007a).

4.2- Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos:

1- Controle (CTR): animais permaneceram sedentários durante 5 semanas e após esse período foram submetidos à administração intratraqueal de NaCl 0,9%.

2- Exercício Aeróbico (Exe): animais foram submetidos ao treinamento físico aeróbico de intensidade leve (50% da máxima capacidade física) durante 5 semanas e após esse período receberam administração intratraqueal de NaCl 0,9% .

3- Lesão Pulmonar Aguda (LPS): animais permaneceram sedentários durante 5 semanas e após esse período foram submetidos à administração intratraqueal de *E. Coli* LPS (200 µg), sendo sacrificados 24 horas depois.

4- Exercício Aeróbico + Lesão Pulmonar Aguda (Exe+LPS): animais submetidos previamente ao treinamento físico aeróbico de intensidade leve (50% da máxima capacidade física) durante 5 semanas, e após esse período submetidos à administração intratraqueal de *E.coli* LPS (200 µg) e sacrificados 24 depois.

4.3- Protocolo de teste e treinamento físico

O treinamento físico aeróbico foi realizado em esteira ergométrica adaptada para camundongos (modelo KT 400, marca Imbramed[®], RS, Brasil), por um período de 05 semanas.

Na semana anterior ao período de treinamento, os animais foram submetidos a 03 dias de adaptação na esteira ergométrica que constou de 10 minutos a uma velocidade de 0,2 Km/h. Quarenta e oito horas após o terceiro dia de adaptação, os animais foram submetidos a um teste de esforço máximo.

O teste consistiu de 05 minutos de aquecimento a uma velocidade de 0,2 Km/h que foi aumentada em 0,1 Km/h a cada 2,5 minutos até a exaustão dos animais. Os animais foram considerados exaustos quando não conseguiram permanecer correndo mesmo após 10 estímulos mecânicos.

A intensidade do treinamento (leve = 50%) foi calculada a partir da velocidade máxima atingida no teste.

O treinamento foi realizado 03 vezes por semana, 60 minutos por sessão, durante 05 semanas. Após este período, o teste físico foi repetido com o intuito de reavaliar o condicionamento físico dos animais (Vieira, 2007a).

4. 4- Indução da lesão pulmonar aguda

Nos grupos LPS e Exe+LPS, os animais receberam *E. coli* LPS (026: B6, 200µg it.) suspenso em solução salina com volume de 0,05 ml. Para instilação intratraqueal, os camundongos foram anestesiados com Ketamina (0,04 ml/animal) e Xilasina (0,01 ml/animal) em seguida receberam LPS instilado por agulha fina através de uma incisão de cerca de 1cm na linha média cervical anterior, para exposição da traquéia. A incisão foi suturada com fio 5.0 e os camundongos retornaram para suas gaiolas (Santos et al., 2006).

4.5- Avaliação da mecânica pulmonar

Vinte e quatro horas após a instilação do LPS, os animais foram anestesiados com Pentobarbital sódico (50 mg/kg, por via intraperitoneal), traqueostomizados com catéter intravascular 20G e conectados a um respirador para pequenos animais (FlexiVent, SCIREQ, Montreal, Canadá). Os animais foram ventilados com um volume corrente de 10 ml/Kg e frequência respiratória de 120 ciclos/minuto. Foi utilizado um PEEP de 5 cmH₂O, conectado à válvula expiratória do ventilador.

Posteriormente foi induzida uma paralisia muscular através de uma injeção intraperitoneal de Brometo de Pancurônio (1mg/Kg) e foram avaliadas, através de técnica de oscilação forçada e de fase constante, as medidas: Raw (resistência das

vias aéreas), Law (inertância das vias aéreas), Gtis (resistência do tecido pulmonar) e Htis (elastância do tecido pulmonar) (Hantos et al., 1992; Lopes, 2007).

4.6- Coleta e análise do óxido nítrico exalado

Após anestesia e sob ventilação mecânica (condições descritas no item acima), um balão mylar foi conectado na válvula expiratória do ventilador por um período de 5 minutos. Após os 5 minutos, o balão foi retirado, fechado e analisado através do método de quimioluminescência (NOA 280; Sievers Instruments, nInc., Boulder, CO).

Antes de cada mensuração, o analisador foi calibrado com uma fonte de 47 ppb de NO (White Martins, São Paulo - Brazil) e um filtro zero de NO (Sievers Instruments, Inc.) (Prado et al., 2006).

4.7- Coleta e análise do sangue

Após a realização da mecânica pulmonar, os animais tiveram o abdômen aberto e foram coletados entre 0,5 e 1,0ml de sangue através da veia cava inferior. O sangue foi centrifugado a 1000 rpm e o soro foi aliquoteado e armazenado a -70°C para avaliação dos níveis de IL-6 e IL-10 (Bozza et al., 2007).

4.8- Coleta e análise do lavado broncoalveolar (LBA)

Após a coleta do sangue, ainda canulados, os pulmões foram lavados com 1,5 ml (3 x 0,5 ml) de soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%) e 1,0 ml do LBA foi recuperado.

Para a análise, 400 μ l de BAL foram centrifugados (1000 rpm, durante 10 minutos) a 05°C, e o sobrenadante coletado e armazenado a – 70° C para outras análises. O botão de células foi ressuspensionado em 0,4ml de soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%) e utilizado para avaliação do número de células totais e diferenciais.

Vinte microlitros foram utilizados para contagem do número total de células com auxílio de uma câmara de Neubauer (Vieira, 2007a). Duzentos microlitros foram utilizados para contagem diferencial após centrifugação (06 min, 450 rpm) (modelo Cytospin-2, *Shandon Instruments* Sewickley, PA) e coloração das lâminas com May-Grun-wald-Giemsa. Foram contadas 300 células por lâmina (Vieira, 2007a).

4.9- Análise dos níveis de citocinas nos pulmões e no soro

Níveis de IL-1 β , IL-6, KC (homólogo de IL-8), IL-10 e TNF- α foram avaliadas no LBA através do kit multiplex de ELISA de acordo com as instruções do fabricante (Duo Set, R&D Systems, Minneapolis, MN) (Menezes et al., 2005).

Para a avaliação dos níveis de citocinas no soro o kit multiplex para IL-6 e IL-10 foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante (Duo Set, R&D Systems, Minneapolis, MN) (Menezes et al., 2005).

A avaliação das citocinas no tecido pulmonar foi realizada com imunohistoquímica (Vieira et al., 2007b). Lâminas previamente preparadas com 3-Aminopropil-trietoxisilano (silane) contendo os cortes histológicos dos pulmões foram inicialmente desparafinadas, hidratadas e submetidas às incubações a 4° C com os anticorpos: anti-IL-6 (1:200) (R&D Systems, Minneapolis, MN) e anti-IL-10 (1:900) (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA). Um kit ABC Vectstain (Vector

Elite PK-6105, Vector Laboratories, CA, USA) foi usado como anticorpo secundário e 3,3 diaminobenzidina (Sigma Chemical Co, MO, USA) foi usado como cromógeno. As células inflamatórias no tecido alveolar positivas para IL-6 e IL-10 foram quantificadas através de morfometria convencional (detalhada abaixo).

4.10- Extravasamento de proteína

Níveis de proteínas foram detectados no LBA através do kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) de acordo com as instruções do fabricante (Kasahara et al., 2008).

4.11- Histologia e morfometria pulmonar

Após a coleta do LBA, o pulmão esquerdo foi clampeado para que o pulmão direito fosse perfundido com 0,15 ml de formol 10% e fosse imediatamente imerso em formol 10% por 24 horas. O pulmão direito foi submetido à rotina histológica para aplicação de técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas.

Cortes de 5 μ m foram corados com hematoxilina e eosina para análise da densidade de células polimorfonucleares.

A expressão de receptores de glicocorticóide (Gre) e de superóxido dismutase (SOD) nas células inflamatórias do tecido pulmonar foi avaliada com imunohistoquímica. Lâminas previamente preparadas com 3-Aminopropil-trietoxissilano (silane) contendo os cortes histológicos dos pulmões foram inicialmente desparafinadas, hidratadas e submetidas às incubações a 4° C com os anticorpos: anti-Gre (1:500) (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), anti-SOD (1:650) (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA). Um kit ABC Vectstain (Vector

Elite PK-6105, Vector Laboratories, CA, USA) foi usado como anticorpo secundário e 3,3 diaminobenzidine (Sigma Chemical Co, MO, USA) foi usado como cromógeno.

A avaliação da densidade de células polimorfonucleares e células positivas para IL-6, IL-10, SOD e Gre foi realizada através de morfometria convencional. Utilizando um retículo de 100 pontos, com uma área conhecida ($62.500 \mu\text{m}^2$) acoplado à ocular do microscópio num aumento de 400x, foram avaliados 15 campos do parênquima de cada animal, escolhidos de maneira aleatória. A área de tecido pulmonar foi calculada a partir do número de pontos que incidiram nos septos alveolares.

A densidade das células foi determinada como o número de células positivas nos septos alveolares dividido pela área de tecido pulmonar. A densidade das células foi expressa em células/ mm^2 (Lanças et al., 2006).

4.12- Determinação da atividade da glutathione peroxidase (GPX)

Este método se baseia na medida indireta da atividade da GPX, por meio de uma reação casada com a glutathione redutase (GR) (Beutler, 1977). A glutathione oxidada (GSSG), produzida pela redução por hidroperóxidos pela GPX, é reciclada para gerar seu estado reduzido pela GR e NADPH.

O substrato utilizado é o terc-butil hidroperóxido. A oxidação de NADPH a NADP^+ é acompanhada pelo decaimento da absorbância a 340 nm e a 37°C.

Para otimização do método avaliou-se a quantidade ideal de proteínas totais (25 a 100µg) e as soluções reagentes (preparadas em tampão fosfato 0,1M pH=7,0 e EDTA 1,0 mM): NADPH 1,2 mM (15 e 30µL) e t-butil hidroperóxido 0,46% V/V (5 e 10µL), mantendo-se constantes as soluções de glutathione reduzida 80mM (5µL) e glutathione redutase 0,0096U/ µL (5µL).

A combinação realizada foi a de 80µg de proteína, 30µL de NADPH e 5µL de t-butil hidroperóxido. Adicionou-se em cada cavidade de uma microplaca, 125µL de tampão fosfato 0,1M pH=7,0 e EDTA 1,0mM; 30µL de amostra (correspondente à 80µg de proteína totais); 5µL de solução de glutathione reduzida (GSH) 80mM; 0,048U de glutathione redutase (5µL da solução 0,0096U/µL). Essa mistura foi incubada por 5 minutos a 37 °C. Logo após, foram adicionados 5µL de solução de terc-butil hidroperóxido 0,46% e 30µL de solução de NADPH 1,20mM. O decréscimo na absorbância foi monitorado a 340nm por 3 minutos. As amostras foram analisadas em triplicata.

A atividade foi determinada pela fórmula:

$$\text{Atividade} = \left[\frac{k}{\xi_{\text{NADPH}} \cdot b} \times \frac{200\mu\text{L}}{30\mu\text{L}} \right] / 80\mu\text{g}$$

Sendo:

Atividade: atividade específica da GPX (U/µg de proteína);

k: inclinação da curva de decaimento (min^{-1});

b: caminho óptico (0,524 cm);

ξ_{NADPH} : $6,22 \times 10^{-3} (\mu M^{-1} cm^{-1})$;

80 μg : quantidade de proteínas totais utilizada no ensaio (80 μg);

$\frac{200 \mu L}{30 \mu L}$: diluição da amostra na cubeta;

30 μL : volume de amostra correspondente à 80 μg de proteína.

4.13- Determinação da atividade de glutathione redutase (GR)

O método se baseia na medida direta da atividade da GR, que utiliza o NADPH como co-fator na redução da GSSG em GSH. A oxidação de NADPH a $NADP^+$ é acompanhada pelo decaimento da absorbância a 340 nm e à 37°C (Carlberg, Mannervik, 1975).

GR

Para otimização do método avaliou-se a quantidade ideal de proteínas totais (20 a 120 μg), mantendo-se os reagentes: NADPH (0,4mg/mL de meio reacional); glutathione oxidada (2 mg/mL de meio reacional) e EDTA 0,005mM (30% V/V em meio reacional).

Os resultados escolhidos foram aqueles que apresentaram maior linearidade e atividade enzimática.

Foi preparado 10mL de meio reagente no momento do uso com: 4mL de tampão fosfato 0,10M pH 7,0 e EDTA 1,0mM; 3mL de EDTA 0,005M; 3mL de água deionizada, 0,02g de glutathiona oxidada (GSSG) e 4mg de NADPH. Adicionou-se em cada poço de uma microplaca 20μL (volume de amostra correspondente à 80μg de proteínas totais) e 180μL de meio reacional.

O decréscimo dos valores de absorbância foi monitorado a 340nm por 5 minutos à 37°C. As amostras foram analisadas em triplicata.

A atividade foi determinada pela fórmula:

$$Atividade = \left[\frac{k}{\xi_{NADPH} \cdot b} \times \frac{200\mu L}{20\mu L} \right] / 80\mu g$$

Sendo:

Atividade = atividade específica da GR (U/μg de proteína)

k = inclinação da curva de decaimento (min⁻¹)

b = caminho óptico (0,524 cm)

$\xi_{NADPH} = 6,22 \times 10^{-3} (\mu M^{-1} cm^{-1})$

80μg = quantidade de proteínas totais utilizada no ensaio

$\frac{200\mu L}{20\mu L}$ = diluição da amostra na cubeta

20μL = volume de amostra correspondente à 80μg de proteína.

4.14- Determinação da glutathione S-transferase (GST)

O método se baseia na formação de um complexo entre a GSH e o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), catalisada pela GST. O aumento de absorbância é diretamente proporcional à atividade da GST na amostra (Habig et al., 1974).

Para otimização do método, avaliou-se a quantidade ideal de proteínas totais (10 a 100µg) e as soluções reagentes de CDNB 0,1M, preparada em etanol absoluto (5 e 10µL) e de glutathione reduzida, preparada em tampão fosfato 0,1M pH= 6,5 (10, 15 e 20µL), além do tempo de incubação o qual variou entre 2, 5 e 10 minutos.

Adicionou-se em cada cavidade de uma microplaca, 20µL (volume de amostra correspondente a 80µg de proteínas totais), tampão fosfato 0,1M pH=6,5 (160µL); 5µL de solução de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 0,1M. Esta mistura foi pré-incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 15µL de glutathione reduzida (GSH) 0,1M. O aumento na absorbância foi monitorado a 340nm por 5 minutos à 25°C. As amostras foram analisadas em triplicata.

A atividade foi determinada pela fórmula:

$$Atividade = \left[\frac{k}{\xi_{CDNB} \cdot b} \times \frac{200\mu L}{20\mu L} \right] / 80\mu g$$

Sendo:

Atividade = atividade específica da GST (U/ μ g de proteína)

k= inclinação da curva (min^{-1})

b= caminho óptico (0,524 cm)

$\xi_{CDNB} = 9,60 \times 10^{-3} (\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$

80 μ g = quantidade de proteínas totais utilizada no ensaio

$\frac{200\mu L}{20\mu L}$ = diluição da amostra na cubeta

20 μ L = volume de amostra correspondente à 80 μ g de proteína.

4.14.1- Determinação da concentração de proteínas

A dosagem foi realizada utilizando-se o método de Bradford (1976), cujo princípio consiste na adição de um corante ácido a uma solução de proteínas, e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm. A comparação com uma curva padrão de soro albumina bovina fornece a concentração de proteínas presente nas amostras.

4.15 - Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase foi medida através do consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Aebi, 1984). O decaimento na absorbância é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.

Para otimização do método avaliou-se a quantidade ideal de amostra (50, 75, 80, 85, 100 μ l) e as soluções reagentes, volume de tampão fosfato 50mM Ph=7,0 (300, 310, 315, 320, 325, 350 μ l), e volume de H₂O₂ 0,56% (56,2 μ L de H₂O₂ com qsp 10 mL de tampão fosfato 50mM, pH= 7,0) (100, 105, 110, 125 μ l). Após escolher o melhor volume de amostra, padronizou-se a concentração de proteínas (50, 53, 55 μ g).

A combinação escolhida foi a de 80 μ l (50 μ g de proteína), 310 μ L de tampão fosfato e 110 μ L de H₂O₂, apresentando reprodutibilidade, maior atividade e alta linearidade.

Adicionou-se uma cubeta de quartzo (500 μ L), 80 μ L de amostra (50 μ g de proteína), 310 μ L de tampão fosfato (50mM, pH 7,0) e 100 μ L de solução de H₂O₂ 0,56%. A leitura foi realizada por 60 segundos à 240 nm e à temperatura ambiente. O branco consistiu no valor de absorbância medido antes da adição da solução de H₂O₂ 0,56% na cubeta.

A atividade foi determinada pela fórmula:

$$\text{Atividade} = \left[\frac{k}{\xi_{H_2O_2} \cdot b} \times \frac{500 \mu L}{80 \mu L} \right] \times 50 \mu g$$

Sendo:

Atividade: atividade específica da GPx (U/ μ g de proteína);

k: inclinação da curva de decaimento (min⁻¹);

b: caminho óptico (1cm);

$\xi_{H_2O_2}$: 3,94 x 10⁻³ (μ M⁻¹.cm⁻¹)

[HB]: concentração de hemoglobina encontrada na amostra;

$\frac{500\mu\text{L}}{80\mu\text{L}}$: diluição da amostra na cubeta;

80 μL : volume de amostra;

50 μg : concentração de proteína

4.16 - Determinação da atividade da cu/znsod

A enzima Cu/ZnSOD dismuta o $\text{O}_2^{\bullet-}$ na presença de H^+ formando H_2O_2 e H_2O . No ensaio utilizou-se o sistema hipoxantina-xantina oxidase como gerador de $\text{O}_2^{\bullet-}$. O ferricitocromo C é reduzido na presença do $\text{O}_2^{\bullet-}$ e a taxa de redução foi monitorada espectrofotometricamente à 550 nm e à 25°C. A Cu/ZnSOD compete pelo $\text{O}_2^{\bullet-}$ diminuindo a taxa de redução do ferricitocromo C. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de SOD que inibe a taxa de redução do ferricitocromo C, sobre condições específicas, em 50% (Mccord, Fridovich, 1969; Flohé, Ötting, 1984).

Para a remoção de interferentes (como Hb, albumina, NADPH, ácido ascórbico e lipídeos) realizou-se uma extração líquido-líquido com uma mistura de solventes contendo etanol/clorofórmio (62,5:37,5 v/v). Adicionou-se um eppendorf 125 μL da amostra de eritrócitos (1:5) e 200 μL da mistura de solventes. Em seguida, centrifugou-se a 3000xg por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante retirado e reservado para as análises.

Preparou-se um meio reacional composto por 37,5 mL de tampão fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (50mM – pH 7,8) com EDTA 0,1mM; 10 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 10mM; 6,2 mg de ferricitocromo C e 0,68 mg de hipoxantina.

Para determinar a taxa de redução do ferricitocromo C na ausência de CuZnSOD, adicionou-se à uma cubeta de quartzo, 950 μL de meio reacional, 25 μL de tampão fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (50mM – pH 7,8) e 25 μL de uma solução de xantina

oxidase (preparada imediatamente antes da adição à cubeta) na concentração que produziu um aumento na absorbância de $0,025 \cdot \text{min}^{-1}$ ($\sim 0,8$ U/mL). A leitura foi realizada por 3 minutos à 550 nm e à 25°C. Para determinar a porcentagem de inibição (%I) na taxa de redução do ferricitocromo C produzida pela presença de CuZnSOD, realizou-se a leitura, adicionando-se à cubeta 950 μL de meio reacional, 25 μL de amostra extraída e 25 μL da solução de xantina oxidase ($\sim 0,8$ U/mL). O branco consistiu na leitura da adição de 950 μL meio reacional e 50 μL de tampão fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (50mM – pH 7,8) à cubeta de quartzo. As amostras foram analisadas em duplicata.

4.17- Quantificação do malonaldeído (MDA)

A quantificação do malonaldeído (MDA) foi avaliada para determinação da peroxidação lipídica. O método se baseia na reação de MDA com ácido tiobarbitúrico (TBA) para formação do produto dosado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/DAD), com detecção por absorbância a 532 nm (Svingen et al., 1979).

As análises foram conduzidas em um equipamento de HPLC da empresa Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AT, um detector de arranjo de fotodiodos PDA-20AV, um auto-injetor (Proeminence SIL-20AC) e um forno para colunas (CTO-10AS/VP) controlado por um módulo de comunicação CBM-20A. Os dados foram processados utilizando-se o software LC-Solution (Shimadzu Corporation, Japão). A seguinte condição cromatográfica foi utilizada: coluna Luna C18 (2) 150 mm x 4,6 mm ID, 5 μm (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com

65% de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 e 35% de metanol a um fluxo de 1 mL/min por 10 min.

A análise do produto MDA-TBA foi feita a 532 nm, com tempo de retenção de aproximadamente 6 min. Uma curva de calibração no intervalo de 0,1 a 10 μ M de MDA em solução salina (PBS) foi processada sempre em conjunto com as amostras para possibilitar a quantificação.

Em 20mL do homogenato de pulmão foram adicionados 3 μ L de hidroxitolueno butilado (BHT) (0,2 % em etanol) e 121 μ L de solução contendo 7,2% de ácido tricloroacético (TCA) e 1% de iodeto de potássio. A solução foi mantida em gelo por 10 minutos para precipitação das proteínas e centrifugada a 3.300 rpm por 10 minutos. O volume de 80 μ L do sobrenadante foi coletado, transferido para tubo com tampa rosqueável, adicionado a 40 μ L de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA - 0,6% em água) e aquecido a 90 °C por 45 min sob agitação. O produto gerado foi extraído com n-butanol (100 μ L) sob agitação vigorosa (vortex) por 15 segundos e centrifugação a 2000 rpm por 10 min. O volume de 10 μ L da fase n-butanólica foi injetado no sistema de HPLC.

4.18 - Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software SPSS 15.0® (SPSS, Chicago, Illinois, USA, 2004). A distribuição dos dados foi avaliada com o teste Kolmogorov-Smirnov. Após a análise de distribuição dos dados, a comparação entre os grupos foi feita utilizando-se análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo pós-teste Tukey ou utilizando-se o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste Bonferroni.

Transformação logarítmica foi realizada quando os dados apresentaram distribuição não-paramétrica. A resistência pulmonar foi o único parâmetro que mostrou distribuição paramétrica dos dados após transformação logarítmica. Uma análise de variância multivariada foi realizada para demonstrar os efeitos do LPS e do exercício nos diferentes parâmetros analisados. Este teste também evidencia o efeito de interação dos dois fatores (LPS e exercício). As associações entre os diferentes parâmetros nos animais tratados com LPS foram avaliada pelos testes de Pearson ou Spearman. Os resultados foram expressos em médias $\pm$ DP ou mediana (IIQ). Os níveis de significância foram ajustados para 5% ($p < 0.05$).

5.0 – RESULTADOS

5.1- Critérios exigidos pela ATS para modelos de LPA em animais

Nosso modelo de LPA por instilação intratraqueal de LPS se caracterizou por intenso infiltrado neutrofílico no espaço aéreo pulmonar e no LBA, aumento da resistência pulmonar, aumento da concentração de proteínas no LBA, aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias no LBA e tecido pulmonar, aumento espontâneo da ventilação minuto, além de descoloração dos pulmões. Deste modo, atendeu aos critérios estabelecidos pelo workshop da ATS de 2009 sendo considerado um modelo de LPA em animal (Matute-Belo et al., 2011).

5.2- Testes de capacidade máxima

Os animais foram pesados e submetidos ao teste de esforço antes e após o treinamento de 5 semanas.

Os animais não treinados demonstraram uma significativa redução da capacidade máxima de exercício quando comparados os testes finais com os testes iniciais (teste 1= 1,5 Km/h e teste 2= 1,2 Km/h) ($p=0,001$). Também demonstraram significativa redução do tempo de permanência na esteira (teste 1= 37 minutos e teste 2 = 30 minutos) ($p<0,001$)

Os animais treinados não demonstraram diferença significativa entre os testes finais e iniciais (teste 1= 1,6 Km/h e teste 2 = 1,6 Km/h), ou no tempo de permanência na esteira (teste 1= 37 minutos e teste 2 = 38 minutos).

Não houve variação estatisticamente significativa dos pesos iniciais e finais entre os grupos.

5.3 - Mecânica respiratória

As figuras 5 e 6 demonstram os valores de elastância e resistência pulmonar. O grupo LPS mostrou valores de elastância e resistência pulmonares significativamente mais altos que o grupo CTR ($p=0,018$ e $p=0,017$, respectivamente). O exercício aeróbico (Exe+LPS) determinou uma tendência à diminuição de ambas elastância ($p=0,06$) e resistência ($p=0,05$) quando comparado ao grupo LPS. Não houve diferença significativa entre os grupos Exe+LPS e Exe ou CTR. Além do significativo efeito do LPS ($p=0,03$), a análise multivariada demonstrou uma significativa interação entre os efeitos do LPS e exercício nos valores de resistência e elastância pulmonar ($p = 0,03$).

Figura 5- Valores de elastância pulmonar nos quatro grupos. * indica valor significativamente diferente dos grupos CTR e Exe ($p=0,018$). CTR (controle): animais instilados com salina e não treinados; Exe (exercício): animais instilados com salina e treinados; LPS: animais instilados com LPS e não treinados; Exe+LPS animais instilados com LPS e treinados.

Figura 6- Valores de resistência nos quatro grupos. * indica valor significativamente diferente dos grupos CTR e Exe ($p=0,017$). CTR (controle): animais instilados com salina e não treinados; Exe (exercício): animais instilados com salina e treinados; LPS: animais instilados com LPS e não treinados; Exe+LPS animais instilados com LPS e treinados.

5.4 - Concentração de NO exalado.

A Figura 7 demonstra a concentração de NO exalado nos quatro grupos. A instilação de LPS determinou um aumento na concentração de NO exalado comparado aos grupos CTR e Exe ($p<0,01$). O exercício aeróbico atenuou significativamente este efeito, diminuindo os valores no grupo Exe+LPS comparado ao grupo LPS ($p=0,006$).

Entretanto, estes valores foram significativamente maiores que o grupo CTR ($p=0,023$). Além do significativo efeito de ambos LPS ($p<0,001$) e exercício ($p=0,029$) nas concentrações de NO exalado, a análise multivariada também demonstrou uma interação dos efeitos do LPS e exercício ($p = 0,01$).

Figura 7. Valores de óxido nítrico exalado. * indica valores significativamente diferentes dos grupos CTR e Exe ($p<0,01$ e $p=0,023$, respectivamente). # indica valor significativamente diferente do grupo LPS ($p=0,006$). CTR (controle): animais instilados com salina e não treinados; Exe (exercício): animais instilados com salina e treinados; LPS: animais instilados com LPS e não treinados; Exe+LPS animais instilados com LPS e treinados.

5.5 - Extravasamento de proteína no LBA

A concentração de proteína no LBA foi significativamente maior nos grupos LPS [3,86 (1,99) $\mu\text{g/ml}$] e Exe+LPS [3,41 (2,47) $\mu\text{g/ml}$] comparados aos grupos Exe [1,73 (0,43) $\mu\text{g/ml}$] e CTR [1,88 (0,59) $\mu\text{g/ml}$] ($p \leq 0,02$). Não houve diferenças entre os grupos LPS e Exe+LPS. A análise multivariada confirmou o efeito do LPS em aumentar a concentração de proteína no LBA ($p < 0,001$) e não detectou um efeito de interação entre LPS e exercício.

5.6 - Contagem celular no LBA

A contagem celular no LBA é demonstrada na tabela 1. O número total de células e de neutrófilos no LBA foi significativamente maior nos grupos LPS e Exe+LPS comparados aos grupos Exe e CTR ($p < 0,001$). Não houve diferenças dos números de células totais e de neutrófilos entre os grupos LPS e Exe+LPS. Não houve diferenças entre os números de linfócitos, macrófagos e eosinófilos entre os quatro grupos. A análise multivariada confirmou o efeito do LPS em aumentar o número de células totais e de neutrófilos ($p < 0,001$), porém não demonstrou o efeito de interação entre LPS e exercício.

Tabela 1- Contagem de células totais e diferenciais no lavado broncoalveolar (cels x $10^4/\text{ml}$).

	Controle	Exe	LPS	Exe+LPS	p
Células totais	1,35± 1,71	1,30± 2,01	8,73 ± 3,08*	7,30 ± 0,68*	<0,001
neutrófilos	0,04± 0,04	0,04± 0,05	7,28± 1,56*	6,00 ± 3,02*	<0,001
Linfócitos	0,04 ± 0,07	0,02± 0,02	0,15± 0,14	0,16 ± 0,20	ns
macrófagos	1,11 ± 0,5	1,00± 0,60	1,12± 0,6	0,86 ± 0,6	ns
eosinófilos	0,019 ± 0,04	0	0,01± 0,03	0,04 ± 0,05	ns

Valores são expressos em médias ± DP.

*Significativamente diferente dos grupos CTR e Exe. ns=não significativo

LPS= Escherichia coli lipopolissacarídeo

5.7- Citocinas no soro

Os níveis de citocinas no soro são demonstrados na tabela 2. Os níveis de IL-6 no soro foram significativamente maiores nos grupos LPS e Exe+LPS comparados aos grupos Exe e CTR ($p \leq 0,001$). Não houve diferenças entre os grupos LPS e Exe+LPS. A análise multivariada confirmou o efeito do LPS em aumentar os níveis de IL-6 no soro ($p < 0,001$) e não detectou um efeito de interação entre o LPS e exercício. Embora tenha havido uma significativa diferença entre os níveis de IL-10 no soro entre os grupos ($p = 0,02$), o teste pós hoc não detectou esta diferença. Entretanto, a análise

multivariada demonstrou o efeito significativo do LPS nos níveis de IL-10 no soro ($p=0,027$), sem demonstrar um efeito de interação do LPS e exercício.

Tabela 2- Níveis de citocinas no soro (ng/ml)

	CTR	Exe	LPS	Exe+LPS	p
IL-6	$0,016 \pm 0,008$	$0,011 \pm 0,003$	$0,096 \pm 0,029^*$	$0,059 \pm 0,037^*$	$\leq 0,001$
IL-10	$0,013 \pm 0,034$	$0,058 \pm 0,278$	$0,351 \pm 0,176^{**}$	$0,111 \pm 0,215$	0,027

Valores expressos em médias $\pm$ DP.

*Significativamente diferente dos grupos CTR e Exe; **significativamente diferente do grupo CTR.

LPS= Escherichia coli lipopolissacarídeo.

5.8- Citocinas no LBA

Os níveis de citocinas no LBA são demonstrados na tabela 3. Os níveis de IL-6 e IL-10 no LBA foram significativamente maiores no grupo Exe+LPS comparado aos grupos CTR e Exe ($p<0,02$). Além do significativo efeito do LPS nos níveis de IL-6 e IL-10 no LBA ($p\leq 0,005$), a análise multivariada demonstrou um efeito de interação entre o LPS e exercício ($p=0,04$). O nível de KC no LBA foi significativamente maior nos grupos LPS e Exe+LPS comparados aos grupos Exe e CTR ($p<0,001$). Não houve diferença no nível de KC no LBA entre os grupos LPS e Exe+LPS. A análise multivariada confirmou o efeito do LPS ($p<0,001$) e não detectou um efeito de interação entre o LPS e exercício.

Não houve diferença entre os níveis de IL-10 e TNF- α entre os grupos.

Tabela 3 - Níveis de citocinas no LBA (ng/ml).

	CTR	Exe	LPS	Exe+LPS	p
IL-6	0,015 ± 0,002	0,011 ± 0,005	0,541 ± 0,4	0,767 ± 0,6*	<0,001
IL-1β	0,150 ± 0,03	0,106 ± 0,06	0,161 ± 0,18	0,357 ± 0,2*	<0,02
KC	0,017 ± 0,01	0,013 ± 0,007	0,596 ± 0,2*	0,626 ± 0,1*	<0,001
IL-10	0,009 ± 0,03	0,050 ± 0,04	0,066 ± 0,07	0,056 ± 0,04	ns
TNF-α	0,018 ± 0,01	0,028 ± 0,01	0,027 ± 0,01	0,032 ± 0,02	ns

Valores são expressos em médias ± DP

*Significativamente diferente dos grupos CTR e Exe. ns= não significativo.

LPS= Escherichia coli lipopolissacarídeo.

5.9- Polimorfonucleares no tecido pulmonar

A Figura 8 demonstra a quantidade de células polimorfonucleares (PMN) no tecido pulmonar nos quatro grupos. A instilação de LPS determinou um aumento da quantidade de PMN comparado aos grupos CTR e Exe ($p < 0,001$). O exercício físico aeróbico atenuou significativamente este aumento. Os valores de PMN nos grupos Exe+LPS foram significativamente menores comparados ao grupo LPS ($p = 0,004$) e significativamente maiores que os grupos CTR e Exe ($p \leq 0,001$). Além do significativo efeito de ambos LPS ($p < 0,001$) e exercício ($p = 0,029$) na quantidade de PMN, a análise multivariada também mostrou um efeito de interação d LPS e exercício ($p = 0,01$).

Figura 8- Densidade de neutrófilos no tecido pulmonar. * indica valores significativamente diferente dos grupos CTR e Exe ($p \leq 0,001$). # indica valores significativamente diferente do grupo LPS ($p = 0,004$). CTR (controle): animais instilados com salina e não treinados; Exe (exercício): animais instilados com salina e treinados; LPS: animais instilados com LPS e não treinados; Exe+LPS animais instilados com LPS e treinados.

Figura 9- Fotomicrografia digital de tecidos pulmonares de camundongos. Observar as diferentes densidades de polimorfonucleares nos quatro grupos. A= CTR, B= LPS, C= Exe, D= Exe+LPS. As setas demonstram os neutrófilos em cada grupo.

5.10 - Expressão de citocinas no tecido pulmonar

As Figuras 10 e 12 demonstram a expressão de IL-6 e IL-10 no tecido pulmonar nos quatro grupos. A expressão de IL-6 foi significativamente maior nos grupos Exe+LPS e Exe comparados aos grupos LPS e CTR ($p \leq 0,04$). Não houve diferença na expressão de IL-6 entre os grupos LPS e CTR. A expressão de IL-10 no tecido pulmonar foi significativamente maior no grupo Exe+LPS comparado aos grupos LPS ($p=0,001$) e CTR ($p=0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos LPS e CTR. Além do significativo efeito do exercício na expressão de IL-6 ($p < 0,001$) e IL-10 ($p=0,002$), a análise multivariada demonstrou uma significativa interação entre o LPS e exercício na expressão de IL-10 ($p=0,013$).

Figura 10 - Expressão de IL-6 no tecido pulmonar. * indica valores significativamente diferentes dos grupos CTR e LPS ($p \leq 0,04$). CTR (controle): animais instilados com salina e não treinados; Exe (exercício): animais instilados com salina e treinados; LPS: animais instilados com LPS e não treinados; Exe+LPS animais instilados com LPS e treinados.

Figura 11- Fotomicrografia digital de tecidos pulmonares de camundongos. As setas indicam células positivas para IL-6. A= CTR, B= LPS, C= Exe, D=Exe+LPS.

Figura 12- Expressão de IL-10 no tecido pulmonar. * indica valores significativamente diferentes dos grupos CTR e LPS ($p=0,001$). CTR (controle): animais instilados com salina e não treinados; Exe (exercício): animais instilados com salina e treinados; LPS: animais instilados com LPS e não treinados; Exe+LPS animais instilados com LPS e treinados.

Figura 13- Fotomicrografia digital de tecidos pulmonares de camundongos. As setas indicam células positivas para IL-10. A= CTR, B= LPS, C= Exe, D=Exe+LPS.

5.11- Atividades enzimáticas no tecido pulmonar

A atividade enzimática no tecido pulmonar é demonstrada nas figuras 14 e 15. Os níveis de GPX e GR foram significativamente maiores no grupo Exe+LPS comparados aos grupos Exe e CTR ($p \leq 0,02$). O nível de GR também foi significativamente maior no grupo LPS comparado ao grupo Exe ($p=0,03$). A análise multivariada confirmou o efeito do LPS ($p < 0,001$) e não detectou um efeito de interação do LPS e exercício nos níveis de GPX e GR no tecido pulmonar. Não houve diferenças nos níveis CAT, GST, SOD e MDA entre os quatro grupos.

Figura 14– Atividade enzimática de GPX no tecido pulmonar. * indica valores diferentes dos grupos Exe e CTR ($p \leq 0,02$). CTR (controle): animais instilados com salina e não treinados; Exe (exercício): animais instilados com salina e treinados; LPS: animais instilados com LPS e não treinados; Exe+LPS animais instilados com LPS e treinados.

Figura 15- Atividade enzimática de GR no tecido pulmonar. * indica valores diferentes dos grupos Exe e CTR ($p \leq 0,02$). # indica valor diferente do grupo Exe ($p = 0,03$). CTR (controle): animais instilados com salina e não treinados; Exe (exercício): animais instilados com salina e treinados; LPS: animais instilados com LPS e não treinados; Exe+LPS animais instilados com LPS e treinados.

5.12- Expressão de SOD no tecido pulmonar

A expressão de SOD no tecido pulmonar é demonstrada na figura 16 nos quatro grupos. A expressão de SOD no tecido pulmonar foi significativamente maior no grupo CTR comparado aos grupos LPS e Exe+LPS ($p \leq 0,002$). Não houve diferença entre os grupos LPS e Exe+LPS bem como entre os grupos Exe e CTR. A análise multivariada demonstrou um efeito significativo do LPS na diminuição da expressão de SOD no tecido pulmonar ($p < 0,001$) e não demonstrou um efeito de interação entre o LPS e exercício.

Figura 16 - Expressão de SOD no tecido pulmonar. * indica valores significativamente diferentes do grupo CTR ($p \leq 0,002$). CTR (controle): animais instilados com salina e não treinados; Exe (exercício): animais instilados com salina e treinados; LPS: animais instilados com LPS e não treinados; Exe+LPS animais instilados com LPS e treinados.

5.13 - Expressão de receptores de glicocorticóide no tecido pulmonar

A figura 17 demonstra a expressão de Gre no tecido pulmonar nos quatro grupos. A expressão de Gre foi significativamente maior no grupo Exe+LPS comparado aos grupos CTR e LPS ($p \leq 0,01$). Não houve diferença entre os grupos LPS e CTR. A análise multivariada confirmou o efeito do exercício em aumentar a quantidade de receptores de glicocorticóide no tecido pulmonar ($p < 0,001$), além de mostrar um efeito marginal do LPS neste aumento ($p = 0,05$). Não foi detectado efeito de interação entre o LPS e exercício.

Figura 17- Expressão de Gre no tecido pulmonar. * indica valores significativamente diferentes dos grupos CTR e LPS ($p \leq 0,01$). CTR (controle): animais instilados com salina e não treinados; Exe (exercício): animais instilados com salina e treinados; LPS: animais instilados com LPS e não treinados; Exe+LPS animais instilados com LPS e treinados.

5.14- Correlações

A **Tabela 4** demonstra as correlações significativas entre os níveis de citocinas e células inflamatórias em animais que receberam LPS (grupos LPS e Exe+LPS).

	<i>Neutro T</i>	<i>Neutro B</i>	<i>IL-10 T</i>	<i>IL-10 B</i>	<i>IL-6 B</i>	<i>IL-1β B</i>
<i>Neutro T</i>			R= - 0,553 p = 0,026			
<i>IL-10 S</i>				R= 0,678 p = 0,015		
<i>IL-6 T</i>	R= - 0,64 p = 0,007	R= - 0,574 p = 0,020	R= 0,524 p = 0,037			
<i>IL-6 B</i>						R= 0,869 p <0,001
<i>KC B</i>				R= 0,504 p = 0,047	R= 0,729 p = 0,001	R= 0,653 p <0,006

Neutro T = neutrófilo no tecido pulmonar, *Neutro B* = neutrófilo no LBA, *IL-10 T* = IL-10 no tecido pulmonar, *IL-10 B* = IL-10 no LBA, *IL-10 S* = IL-10 no soro, *IL-6 T* = IL-6 no tecido pulmonar, *IL-6 B* = IL-6 no LBA, *IL-1 β B* = IL-1 β no LBA, *KC B* = KC no LBA. **R** = valores de correlação, **p** = significância.

6.0- DISCUSSÃO

Este estudo investigou os efeitos do exercício aeróbico em um modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS. A instilação de LPS resultou no aumento dos níveis de óxido nítrico, do número de células totais e neutrófilos no LBA, aumento do número de neutrófilos no tecido pulmonar, valores aumentados da resistência e elastância pulmonar, aumento no extravasamento de proteínas e dos níveis de IL-6 e IL-10 no soro, bem como dos níveis de IL-1 β , IL-6 e KC no LBA. Além disso, aumentou a atividade enzimática de GPX e GR no tecido pulmonar e diminuiu a expressão de SOD no tecido pulmonar.

Mostramos que o exercício de baixa intensidade realizado durante 5 semanas previamente à instilação de LPS diminuiu a resistência e elastância pulmonar, inibiu a infiltração de neutrófilos no tecido pulmonar, diminuiu a concentração de NO exalado e aumentou a expressão de receptores de glicocorticóides no tecido pulmonar. Além disso, o exercício aeróbico aumentou os níveis de IL-6 e IL-10 no tecido pulmonar bem como de IL-1 β no LBA.

Estes resultados sugerem que o exercício pode desenvolver um importante papel protetor contra os efeitos inflamatórios da LPA induzida por LPS, principalmente pelo aumento da liberação de IL-6 e IL-10 e também pela diminuição da inflamação pulmonar.

Alguns estudos têm investigado os efeitos do exercício aeróbico na lesão pulmonar aguda. Mussi et al. (2008) mostraram os benefícios do exercício em um modelo de inflamação pulmonar induzida por isquemia-reperfusão. Os autores observaram que animais treinados apresentaram uma diminuição do extravasamento

de proteína no LBA, bem como nos níveis séricos de IL-1 β e TNF- α e aumento da atividade de SOD. A principal diferença entre o nosso trabalho e o de Mussi et al encontra-se no modelo escolhido para a indução da LPA.

Em nosso estudo, usamos a instilação intratraqueal de LPS como um modelo de LPA. Apesar do fato de ambos os modelos produzirem as características básicas que todo modelo de LPA deve conter como, por exemplo: evidência de lesão tecidual, disfunção fisiológica, evidência do aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar (Matute-Belo et al., 2011), a diferença encontra-se na fase de desenvolvimento ou o estabelecimento da lesão propriamente dita. Enquanto no modelo de LPA induzida por instilação intratraqueal de LPS a lesão inicia-se no epitélio e a apoptose celular parece ser a causa inicial, no modelo de isquemia-reperfusão a lesão inicia-se tanto no endotélio capilar quanto no epitélio alveolar e, além da apoptose celular, a necrose também é característica deste modelo (Matute-Belo et al., 2008). Além disso, enquanto a lesão por instilação intratraqueal de LPS promove alterações pulmonares iniciais entre 2-4 horas, e sua fase tardia entre 24 a 48 horas, a isquemia-reperfusão atinge as alterações pulmonares em 1 hora após a reperfusão e sua fase tardia se dá no período entre 12-18 horas (Matute-Belo et al., 2008), demonstrando uma característica mais agressiva da lesão em um curto período de tempo. Essas particularidades demonstram as diferenças entre os mecanismos que induzem a lesão nos dois modelos. Enquanto no modelo por LPS ocorre a lesão em grande parte pela atuação neutrofílica em eliminar o agente infeccioso, na isquemia-reperfusão a lesão acontece principalmente pela reperfusão, que traz consigo as conseqüências da toxicidade pelos altos níveis de oxigênio.

Durante a respiração celular normal, uma pequena fração de oxigênio é utilizada para formação de ânions superóxidos, os quais podem ser transformados em radicais peridróxidos ou podem formar peróxido de hidrogênio (Matute-Belo et al., 2008).

Normalmente, após a produção oriunda da respiração celular, os superóxidos e peróxidos de hidrogênio são neutralizados pelas enzimas antioxidantes. Na presença da hiperóxia, grandes quantidades de ânions superóxidos são produzidas, excedendo a capacidade dos antioxidantes em consumi-las causando acúmulo de radicais livres. Os radicais livres oxidam proteínas, peroxidam a membrana lipídica e os ácidos nucléicos, causando lesão (Matute-Belo et al., 2008).

Essas diferenças entre os dois modelos poderiam justificar, por exemplo, porque em nosso estudo encontramos um maior acúmulo de neutrófilos nos pulmões dos animais instilados com LPS, demonstrando o caráter mais inflamatório do modelo, que o exercício foi eficiente em diminuir. Já o modelo de Mussi estabeleceu um caráter mais oxidativo da lesão, o que determinou a atuação do exercício em promover efeitos antioxidantes evidenciados pelo aumento de SOD no plasma dos animais treinados e não a diminuição da atividade neutrofílica.

Outra importante diferença entre os dois modelos foi a mudança encontrada no perfil das citocinas. O fato da lesão no modelo de isquemia-reperfusão ser estabelecida em menor intervalo de tempo propicia uma avaliação mais precoce de seus efeitos. Isso justificaria, por exemplo, porque foi possível no estudo de Mussi et al evidenciar tanto as altas concentrações de TNF- α no plasma, como o efeito benéfico do exercício em diminuí-las. Embora o TNF- α seja o maior mediador da sepsis induzida por LPS, nós não evidenciamos o aumento de seus níveis no LBA coletados 24 horas após a

instilação de LPS. Esse resultado pode provavelmente ser explicado pelo momento de coleta e análise dos níveis de TNF- α ; após a infusão da endotoxina nos animais, o nível de TNF atinge seu pico em 1 a 2 horas no plasma e 8 horas no LBA. Assim, com uma curta meia vida, o TNF é rapidamente consumido e retorna aos níveis basais dentro de poucas horas (Ulich et al. 1990; Jonh, Dorinsky, 1993; Wu et al., 2009). Acreditamos que a dinâmica de liberação e consumo do TNF- α possa explicar os baixos níveis desta citocina observados em nossos animais.

Observamos que dependendo do compartimento estudado, o aumento de IL-6 foi estimulado por diferentes fatores, uma vez que no soro o aumento foi mediado pelo LPS, enquanto que no LBA foi mediado pela interação entre LPS e exercício e no tecido pulmonar, este aumento foi mediado unicamente pelo exercício.

A IL-6 é uma das primeiras citocinas de fase aguda liberadas na sepsis, seguida pelo aumento de IL-1 β , IL-8, TNF e IL-10. Durante algum tempo a IL-6 foi considerada como uma citocina exclusivamente pró-inflamatória tendo sua presença correlacionada com a mortalidade em casos de pneumonia e SARA (Meduri et al., 1995; Lee et al, 2006). Outros estudos têm demonstrado a função antiinflamatória desta citocina limitando a rotura da barreira alvéolo-capilar pelos neutrófilos (Tilg et al., 1994; Mancuso et al., 1994; Nandi et al. 2009; Xing et al., 1997; Wolters et al., 2009; Dalrymple et al., 1996).

O aumento nos níveis circulantes de IL-6 é um constante achado durante o exercício aeróbico, declinando no período pós-exercício (Drenth et al., 1995; Petersen, Pedersen, 2005; Venihaki et al., 2001). Esta dinâmica da variação plasmática nos níveis de IL-6, induzida pelo exercício, pode explicar os baixos níveis encontrados nos animais exercitados, uma vez que a análise foi realizada 72 horas após o último treino.

Alguns estudos sugerem que o tratamento com IL-6 pode regular sua liberação no plasma através da modulação no eixo hipotálamo - hipófise – adrenal (eixo HPA) em resposta ao LPS (Nandi et al., 2010; Roppele et al., 2010). A hipótese do mecanismo envolvido neste processo é que pequenas quantidades de IL-6 liberadas freqüentemente, produzam, quando necessário, uma resposta balanceada entre ações inflamatórias e antiinflamatórias, visando evitar a morte do indivíduo. Venihaki et al. (2001) demonstraram que prolongadas administrações de IL-6 em humanos levam a um alargamento da glândula adrenal; além de terem identificado a presença de receptores de IL-6 no córtex da adrenal de camundongos administrados com esta citocina. Esses achados têm servido como base para afirmar que a IL-6 possui um efeito estimulatório direto sobre a liberação de glicocorticóide. Aumentos da secreção de glicocorticóide levam a uma restrição da produção prolongada de mediadores pró-inflamatórios prevenindo assim, a propagação da resposta de stress (Venihaki et al., 2001). Acreditamos que o exercício pôde induzir a liberação de IL-6 após cada período de treino em nossos animais. Embora não tenhamos mensurado os níveis de glicocorticóide no plasma, o aumento da expressão de receptores de glicocorticóide nas células inflamatórias dos pulmões dos animais treinados sugere que a modulação do eixo HPA pode estar envolvida nos efeitos antiinflamatórios induzidos pelo exercício.

Além disso, um aumento na expressão de IL-6 pôde ser observado no tecido pulmonar dos animais treinados de ambos os grupos exercício e LPS-exercício. O aumento da expressão tecidual de IL-6 foi associado com a alta expressão de IL-10 no tecido pulmonar, uma citocina com um conhecido efeito antiinflamatório (Ulich et al., 1990, Xing et al., 1997, Petersen; Pedersen, 2005; Wolters, 2009; Roppele et al.,

2010). Interessantemente, também observamos uma associação negativa entre estas duas citocinas antiinflamatórias e a densidade de neutrófilos no tecido pulmonar.

O conjunto de nossos achados sugere que a liberação de IL-6 e IL-10 é o maior mecanismo no efeito protetor do exercício no modelo de LPA induzida por LPS.

Observamos um efeito do exercício em aumentar os níveis de IL-1 β no LBA. A citocina IL-1 β está envolvida no reparo do epitélio alveolar na fase inicial da SARA através da ativação do fator de crescimento epitelial pela via do fator de crescimento alfa (Tickett, Perkins, 2008; Geiser, 2003; Geiser et al. 2001; Geiser et al. 2000). Um dos mais importantes fatores que determinam a gravidade da lesão pulmonar na SARA é a magnitude da lesão na barreira epitélio-alveolar. A possibilidade de diminuir o processo inflamatório no estágio inicial ou acelerar o reparo tecidual pode ser o maior determinante da recuperação pulmonar (Geiser, 2003). Embora o processo de reparo do epitélio envolva vários fatores de crescimento, citocinas e diferentes componentes da matriz extracelular, é possível que outro efeito protetor do exercício na LPA seja promover o reparo tecidual na fase inicial através da liberação de IL-1 β .

O exercício aeróbico não alterou os efeitos do LPS na liberação de KC e no extravasamento de proteína no LBA. Estes achados foram inesperados, uma vez que KC é o maior fator quimiotático para neutrófilos e o exercício induziu uma significativa redução da densidade de neutrófilos. A interpretação desses resultados foi limitada pelo fato dos níveis de KC não terem sido mensurados no soro ou no tecido pulmonar.

Para investigar o papel do stress oxidativo, analisamos a atividade enzimática da GST, CAT, GPX, GR, SOD, os níveis de MDA, e a expressão da SOD no tecido

pulmonar. Os níveis da MDA, usados como índice de stress oxidativo, não foram modificados no grupo LPS se comparado com o grupo controle. Estudos demonstraram que os níveis da MDA atingem seus picos em 4 ou 5 horas após a instilação de LPS (Liaudet et al., 2002; Chu et al., 2005). Mudanças nos níveis da MDA podem ser indetectáveis após 8 ou 24 horas (Liaudet et al., 2002; Kinniry et al., 2006), como evidenciados em nossos animais.

Observamos que a instilação de LPS induziu a ativação da via antioxidante glutathiona pelo aumento das atividades da GPX e GR (Tiple et al., 2007; Lino-Dos-Santos-Franco et al., 2011). Além disso, o LPS reduziu a expressão da SOD no tecido pulmonar, o que pode refletir um consumo excessivo dessas enzimas. De qualquer forma, nós não detectamos um efeito antioxidante do exercício em nosso modelo.

Apesar de não observarmos um efeito direto no aumento da SOD no grupo exercício + LPS, nossos resultados demonstraram uma diminuição dos níveis de NO exalado neste grupo. A literatura demonstra que durante o exercício, a SOD pode funcionar não somente como antioxidante, mas também como substrato para prolongar a meia vida do óxido nítrico no endotélio, com conseqüente manutenção da vasodilatação. Esse processo adaptativo se iniciaria no músculo esquelético e se estenderia sistemicamente (Rush et al., 2000; Graham, 2004; Laughlin, 2003; Rush et al., 2003; Michaelides et al., 2011). É possível que o processo modulatório antiinflamatório do exercício físico envolva também uma melhor utilização da SOD promovendo indiretamente uma vasodilatação. Sabe-se que na SARA, existe a liberação de endotelina, um potente vasoconstrictor pulmonar, responsável pela hipertensão pulmonar na síndrome, sendo também causador de edema alveolar (Snapper et al., 1998; Carpenter et al., 2008). Em virtude de seu efeito vasodilatador,

uma melhor utilização do NO poderia redirecionar o fluxo sanguíneo para áreas melhor ventiladas com a conseqüente melhora da relação ventilação/perfusão (Chatkin et al., 2000).

Em nossos resultados observamos não ter havido variação significativa do peso dos animais entre os grupos. Oscai & Holloszy (1969) avaliaram os pesos corporais de ratos treinados com natação durante 18 semanas. Eles realizaram sessões de natação em grupos, inicialmente 5x/semana, por períodos de 10-120 minutos e; posteriormente evoluíram para 6x/semana por períodos de 240 minutos. Ao final, perceberam que os grupos treinados tiveram uma perda de peso em relação ao controle, devido à perda de gordura. Entretanto tiveram um ganho tanto de proteína quanto de água. Bulbulian et al. (1985) também avaliaram os pesos corporais de animais submetidos a diferentes tempos de treinamento, 5x/semana, durante 10 semanas a uma velocidade de 0,45 Km/h. Ao final de 10 semanas, encontraram aumento de peso corporal de cerca de 5 gramas em cada animal de todos os grupos treinados, independentemente do tempo de treinamento, com uma redução significativa de gordura corporal e aumento de proteína.

Estudos demonstram que durante a realização de exercícios prolongados, ocorre uma grande mobilização de ácidos graxos com efeitos acumulativos de várias sessões de exercício, induzindo lipólise. Este efeito parece ser mediado em parte pela atividade do sistema nervoso simpático (Bulbulian et al., 1985, Oscai, Holloszy, 1969). O grande aumento de massa magra obtida pelos animais treinados após o término dos trabalhos citados pode refletir o estímulo para conservação de aminoácidos, bem como a síntese de proteína muscular, além dos efeitos anabólicos pelos níveis aumentados de hormônios de crescimento secundários ao exercício (Bulbulian et al., 1985).

A grande diferença do tipo de exercício ao qual nossos animais foram submetidos reside no fato de que realizaram sessões de exercício de 60 minutos, de intensidade leve, 3x/semana durante 5 semanas. No primeiro exemplo, os animais foram submetidos a um gradativo aumento de intensidade de exercício, pelo aumento de tempo, em prática diária durante 18 semanas. Assim, era esperado que ao final do trabalho, estes animais apresentassem diminuição de peso corporal, se comparados ao grupo controle. Já no segundo exemplo, os animais também permaneceram longo período em treinamento, porém, com intensidade muito leve, cerca de 1/3 da velocidade imposta aos nossos animais. Apesar do fato de não termos encontrado diferença estatisticamente significativa dos pesos iniciais e finais dos animais entre os grupos, encontramos um aumento médio de cerca de 3 gramas para os animais dos grupos sedentários e treinados. No caso dos grupos treinados, o maior aumento de peso ocorreu naqueles que não foram submetidos à indução de lesão pulmonar, demonstrando uma tendência de perda de peso pelo estímulo infeccioso. Acreditamos que em nossos animais treinados, também possa ter havido substituição de gordura corporal por proteína muscular (massa magra), o que justificaria o aumento de peso nestes grupos. Além disso, sabe-se que o exercício de intensidade leve estimula a neovascularização muscular, promovendo o aumento do aporte sanguíneo para os músculos, o que poderia contribuir também para o aumento do peso final (Carvalho et al., 2004, Amaral et al., 2008).

Segundo Mcardle et al. (2003), para o aprimoramento do ganho de endurance no exercício aeróbico, é necessário que haja implementação da intensidade do exercício, caso contrário ocorre apenas a manutenção da aptidão aeróbica. Quanto maior a intensidade do treinamento acima do limiar aeróbico, maior será o ganho de

endurance em virtude do treinamento. Em nosso estudo, observamos que os animais treinados mantiveram suas aptidões aeróbicas, o que era esperado, uma vez que durante o período de treinamento, nosso objetivo foi reproduzir experimentalmente a prática habitual de uma atividade física de leve intensidade, como por exemplo, caminhada, não promovendo, portanto, aumento na intensidade do exercício.

Os resultados obtidos até agora oferecem estímulo e apresentam novos rumos à pesquisa da SARA, divulgando ainda mais os benefícios que a realização de atividade física regular pode oferecer. A realização de atividade física regular não isenta o indivíduo da exposição a qualquer fator desencadeante da SARA, entretanto, nosso estudo demonstrou que exercícios de intensidade leve, quando realizados regularmente podem oferecer vantagem no balanço inflamatório-antiinflamatório na fase inicial desta síndrome. Na prática, isso poderia significar um menor grau de lesão inflamatória, uma recuperação mais rápida do paciente, com menor tempo de internação em unidades de terapia intensiva (UTI), como também diminuição da probabilidade do aparecimento de seqüelas pós SARA.

Um estudo realizado no ano de 2001 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo avaliou durante 1 ano a prevalência da SARA em pacientes internados na UTI deste serviço. Os resultados demonstraram que 6% desta população apresentaram SARA, com permanência média de 11 dias de internação (Oliveira, Filho, 2006). Segundo dados do Tribunal de Contas do Distrito Federal (TCDF) um dia de internação em UTI custa, em média, R\$1.100,00 em um hospital universitário brasileiro (Vinhadeli, 2008). Se a prática regular de atividade física puder reduzir o tempo de internação dos pacientes com SARA em pelo menos 1 dia, haverá uma considerável redução de gastos.

Deste modo, os resultados obtidos vêm se somar aos vários estudos que mostram os efeitos antiinflamatórios da atividade física e servem de estímulo para criação de projetos de saúde pública que incentivem a prática habitual de atividade física, os quais agiriam no âmbito da prevenção, reduzindo assim os elevados gastos com internações em UTI, além de propiciarem bem estar e qualidade de vida aos cidadãos.

7.0- CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que o exercício físico aeróbico realizado continuamente durante 5 semanas desenvolve um importante papel em proteger o pulmão dos efeitos inflamatórios da LPA induzida por LPS. Os efeitos do exercício são principalmente mediados pelo aumento da expressão de citocinas antiinflamatórias, sugerindo que o exercício aeróbico pode modular o balanço inflamatório antiinflamatório na fase inicial da SARA.

8.0- BIBLIOGRAFIA

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia Celular & Molecular*. 3a ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2000.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121–26.

Amaral SL, Sanchez LS, Chang AJBA, Rossoni LV, Michelini LC. Time course of training-induced microcirculatory changes and of VEGF expression in skeletal muscles of spontaneously hypertensive female rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2008; 41: 424-431.

Antoniazzi P, Pereira Júnior GA, Marson F, Abeid M., Baldisserotto S, Basile-Filho A. Síndrome da angústia respiratória aguda (SARA). *Medicina, Ribeirão Preto*. 1998; 31: 493-506.

Barbas CSV; Amato MBP; Carvalho CRR. Síndrome da angústia respiratória aguda. Disponível em:

http://www.hc.unicamp.br/especialidades_medicas/uti/apostilas/sindangustia.pdf.

Acesso em 07/01/2008.

Belo, CR. SARA/SDRA. In: Faria EC. *Emergências Respiratórias*. Rio de Janeiro: Epub; 2002. p. 97-106.

Beutler E, Blume KG, Kaplan C, Lohr GW, Ramot B, Valentine WN. International Committee for standardization in haematology recommended methods for red-cell enzyme analysis. *British Journal of Haematology*. 1977; 35: 331.

Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes NR, Bozza MT, Faria Neto HCC, Bozza PT. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Critical Care*. 2007;11: 1- 8.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-54.

Browne GW, Pitchumoni CS. Pathophysiology of pulmonary complications of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2006;12: 7087-96.

Bulbulian R, Grunewald KK, Haack RR. Effect of exercise duration on feed intake and body composition of Swiss albino mice. *J Appl Physiol*. 1985; 58:500-5.

Cannon JG, Kluger MT. Exercises enhances survival rate in mice infected with Salmonella Typhimurium. Proc Soc Exp Biol Med. 1984;175: 518-21.

Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. J. Biol. Chem. 1975; 250: 5475-80.

Carpenter T, Schomberg S, Steudel W, Ozimek J, Colvin K, Stenmark K, Ivy DD. Endothelin B receptor deficiency predisposes to pulmonary edema formation via increased lung vascular endothelial cell growth factor expression. Circ Res. 2003; 5; 93: 456-63.

Carvalho CC, Moraes SRA, Chalegre ST, Tashiro T. Quantificação de capilares no tecido muscular esquelético em animais com insuficiência arterial periférica induzida submetidos a treinamento de endurance. Acta Cir Bras 2004;19: 487-93.

Costa Rosa LFPB, Vaisberg MW. Influência do exercício na resposta imune. Rev Bras Med Esporte. 2002; 8: 167-72.

Faust-Chan R, Hybertson B, Flores SC, Wright RM, Repine JE. Initiation and tolerance to acute lung injury: yin-yang mechanisms involving interleukin-1. Chest. 1999;116 (1 Suppl):102S-103S.

Chatkin JM, Djupesland P, Qian W, Haight J, Zamel N. Óxido nítrico exalado no diagnóstico e acompanhamento das doenças respiratórias. J Pneumol. 2000; 26: 36-43.

Chu SJ, Perng WC, Hung CM, Chang DM, Lin SH, Huang KL. Effects of various body temperatures after Lipopolysaccharide-Induced lung injury in rats. CHEST. 2005;128: 327-36.

Dalrymple SA, Slattery R, Aud DM, Krishna M, Lucian LA , Murray R. Interleukin-6 Is Required for a Protective Immune Response to Systemic *Escherichia coli* Infection. Infection and Immunity. 1996; 64: 3231–35.

Dinarello, CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood. 1996; 87: 2095- 47.

Drenth JP, Van Uum SH, Van Deuren M, Pesman GJ, Van der Ven-Jongekrijg J, Van der Meer JW. Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-alpha and IL-1 beta production. J Appl Physiol. 1995; 79:1497-503.

Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL, Walz A, Robertson CR, Carter DC, Grant IS, Pollok AJ, Haslett C. Donnelly EJ et al. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet*. 1993; 341: 643-47.

Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984; 105: 114 –21.

Galhardo FP, Martinez JAB. Síndrome Do Desconforto Respiratório Agudo. 2003; 36: 248-56.

Garcia CSNB, Pelosi P, Rocco PRM. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo Pulmonar e Extrapulmonar: Existem Diferenças? *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2008; 20: 178-83.

Geiser T, Jarreau PH, Atabai K, Matthay MA. et al. Interleukin-1 β augments in vitro alveolar epithelial repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 279: L1184-L90.

Geiser T, Atabai K, Jarreau PH, Ware Lb, Pugin J, Matthay MA. Pulmonary Edema Fluid from Patients with Acute Lung Injury Augments *In Vitro* Alveolar Epithelial Repair by an IL-1 β – dependent mechanism. Am J Respir Crit Care Med. 2000;163:1384–88.

Geiser T. Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury – a translational approach. Swiss Med WKLY. 2003; 133: 586-90.

Graham DA, Rush JWE. Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. J Appl Physiol. 2004; 96: 2088–96.

Gropper MA, Wiener-Kronish J. The epithelium in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. Curr Opin Crit Care. 2008;14:11-5.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S- Transferase. The first enzymatic step in mercapturic formation. The journal of Biological chemistry. 1974; 249: 7130-39.

Hantos Z, Daróczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol.* 1992 ; 72 :168-78.

Jonh RC, Dorinsky PM. Immunologic therapy for ARDS, septic shock, and multiple-organ failure. *Chest.* 1993;103: 932-43.

Kasahara DI, Poynter ME, Othman Z, Hemenway D, van der Vliet A. Acrolein Inhalation Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Cytokine Production but Does Not Affect Acute Airways Neutrophilia. *The Journal of Immunology.* 2008; 18: 736–45.

Kinniry P, Amrani Y, Vachani A, Solomides CC, Arguiri E, Workman A, Carter J, Christofidou-Solomidou M. Dietary flaxseed supplementation ameliorates inflammation and oxidative tissue damage in experimental models of acute lung injury in mice. *Nutrition and Disease.* 2006; 136: 1545 –51.

Lam E, Santos CC. Advances in molecular acute lung injury/acute respiratory distress syndrome and ventilator-induced lung injury: the role of genomics, proteomics, bioinformatics and translational biology. *Current Opinion in Critical Care.* 2008;14: 3-10.

Lanças T, Kasahara DI, Prado CM, Tibério IF, Martins MA, Dolhnikoff M. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. *J Appl Physiol.* 2006; 100: 1610–16.

Laughlin MH, Welshons WV, Sturek M, Rush JW, Turk JR, Taylor JA, Judy BM, Henderson KK, Ganjam VK. Gender, exercise training, and eNOS expression in porcine skeletal muscle arteries. *J Appl Physiol.* 2003; 95:250-64.

Lee YL, Chen W, Chen LY, Chen CH, Lin YC, Liang SJ, Shih CM. Systemic and bronchoalveolar cytokines as predictors of in-hospital mortality in severe community-acquired pneumonia. *J Crit Care.* 2010; 25:176.e7-13.

Liaudet L, Murthy KG, Mabley JG, Pacher P, Soriano FG, Salzman AL, Szabó C. Comparison of Inflammation, Organ Damage, and Oxidant Stress Induced by Lipopolysaccharide Flagellin and Serovar Enteritidis *Salmonella enterica* Serovar Muenchen. *Infection and Immunity.* 2002; 70: 192 - 98.

Lino-dos-Santos-Franco A, Correa-Costa M, Durão AC, de Oliveira AP, Breithaupt-Faloppa AC, Bertoni Jde A, Oliveira-Filho RM, Câmara NO, Marcourakis T, Tavares-de-Lima W. Formaldehyde induces lung inflammation by an oxidant and antioxidant enzymes mediated mechanism in the lung tissue. *Toxicol Lett.* 2011; 207: 278-85.

Lopes FDTQS. O efeito da exposição a níveis ambientais de material particulado no desenvolvimento do enfisema pulmonar em camundongos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Ma AC, Kubes P. Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *J Thromb Haemost.* 2008; 6:415-20.

Malloy JL, Wright JR. In vivo clearance of surfactant lipids during acute pulmonary inflammation. *Respiratory Research.* 2004; 5:1-9.

Malm C. Exercise immunology. The current state of men and mouse. *Sports Med.* 2004; 34: 555-66.

Mancuso G, Tomasello F, Migliardo M, Delfino D, Cochran J, Cook JA, Teti G. Beneficial Effects of Interleukin-6 in Neonatal Mouse Models of Group B Streptococcal Disease. *Infection and Immunity*.1994; 62: 4997- 5002.

Martin C, Papazian L, Payan MJ, Saux P, Gouin F. Pulmonary fibrosis correlates with outcome in adult respiratory distress syndrome. A study in mechanically ventilated patients. *Chest*. 1995;107: 196-200.

Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, Kuebler WM; Acute Lung Injury in Animals Study Group. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011; 44:725-38.

Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008; 295: L379-99.

Mcardle, WD, Katch FI, Katch VL. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.

Mccord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J. Biol. Chem.* 2011; 244: 6056L- 63.

Meduri GU, Kohler G, Headley S, Tolley E, Stentz F, Postlethwaite A. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest.* 1995;108:1303-14.

Menezes SL, Bozza PT, Neto HC, Laranjeira AP, Negri EM, Capelozzi VL, Zin WA, Rocco PR. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. *J Appl Physiol.* 2005; 98: 1777– 83.

Michaelides AP, Soulis D, Antoniadis C, Antonopoulos AS, Miliou A, Ioakeimidis N, Chatzistamatiou E, Bakogiannis C, Marinou K, Liakos C, Stefanadis C. Exercise duration as a determinant of vascular function and antioxidant balance in patients with coronary artery disease. *Heart.* 2011; 97: 832-7.

Mussi RK, Camargo EA, Ferreira T, De Moraes C, Delbin MA, Toro IF, Brancher S, Landucci EC, Zanesco A, Antunes E. Exercise training reduces pulmonary ischaemia-reperfusion-induced inflammatory responses. *Eur Respir J.* 2008; 31: 645- 49.

Nandi D, Mishra MK, Basu A, Bishayi B. Protective effects of interleukin-6 in lipopolysaccharide (LPS)-induced experimental endotoxemia are linked to alteration in hepatic anti-oxidant enzymes and endogenous cytokines. *Immunobiology*. 2010; 215: 443- 51.

Oliveira RHR, Filho AB. Incidência de lesão pulmonar aguda e síndrome da angústia respiratória aguda no centro de tratamento intensivo de um hospital universitário: um estudo prospectivo. *J Bras Pneumol*. 2006; 321: 35-42.

Oscari LB, Holloszy J. Effects of weight changes produced by exercise, food restriction, or overeating on body composition. *The Journal of Clinical Investigation*. 1969; 48: 2124-28.

Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol*. 2005; 98:1154-62.

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IF. Effects of Nitric Oxide Synthases in Chronic Allergic Airway Inflammation and Remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006; 35: 457– 65.

Raghavendran K, Napolitano LM. Definition of ALI/ARDS. *Crit Care Clin.* 2011; 27: 429–437.

Ramos DS, Olivo CR, Quirino Santos Lopes FD, Toledo AC, Martins MA, Lazo Osório RA, Dolhnikoff M, Ribeiro W, Vieira RP. Low intensity swimming training partially inhibits LPS-induced acute lung injury. *Med Sci Sports Exerc.* 2010; 42:113-19.

Ropelle ER, Flores MB, Cintra DE, Rocha GZ, Pauli JR, Morari J, de Souza CT, Moraes JC, Prada PO, Guadagnini D, Marin RM, Oliveira AG, Augusto TM, Carvalho HF, Velloso LA, Saad MJ, Carvalheira JB. IL-6 and IL-10 Anti-Inflammatory Activity Links Exercise to Hypothalamic Insulin and Leptin Sensitivity through IKKb and ER Stress Inhibition. *PLoS Biology.* 2010; 8: 1-20.

Rush JW, Laughlin MH, Woodman CR, Price EM. SOD-1 expression in pig coronary arterioles is increased by exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279: H2068-76.

Rush JW, Turk JR, Laughlin MH. Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284: H1378-87.

Sakayori S. The role of TNF in septic ARDS. *Kansenshogaku Zasshi*. 1992 May; 66: 568-78.

Salles MJC, Sprovieri SRS, Bedrikow R, Pereira AC, Cardenuto SL, Azevedo PRC, Silva TM, Golin V. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepsis – revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. *Rev Ass Med Brasil*. 1999; 45:86-92.

Santos FB, Nagato LK, Boechem NM, Negri EM, Guimarães A, Capelozzi VL, Faffe DS, Zin WA, Rocco PR. Time course of lung parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. *J Appl Physiol*. 2006;100: 98-106.

Sato K, Kadiiska MB, Ghio AJ, Corbett J, Fann YC, Holland SM, Thurman RG, Mason RP. In vivo lipid-derived free radical formation by NADPH oxidase in acute lung injury induced by lipopolysaccharide: a model for ARDS. *FASEB J*. 2002;16:1713-20.

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; 35: 994-1002.

Snapper JR, Thabes JS, Lefferts PL, Lu W. Role of endothelin in endotoxin-induced sustained pulmonary hypertension in sheep. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157: 81-8.

Sugiura H, Ichinose M. Oxidative and nitrative stress in bronchial asthma. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10: 785–97.

Svingen BA, Buege JA, O'Neal FO, Aust SD. The Mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. The propagation of lipid peroxidation. *JBC*. 1979; 254: 5892-99.

Tasaka S. Roles of oxidants and redox signaling in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10: 739-53.

Tickett DR, Perkins GD. IL1 may be elevated but is it all bad in ARDS? *Thorax*. 2008; 63:750-51.

Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*. 1994; 83:113-118.

Tipple TE, Welty SE, Rogers LK, Hansen TN, Choi YE, Kehrer JP, Smith CV. Thioredoxin-related mechanisms in hyperoxic lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007; 37: 405-13.

Ulich TR, Watson LR, Yin SM, Guo KZ, Wang P, Thang H, del Castillo J. The Intratracheal Administration of Endotoxin and Cytokines I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA Expression and the LPS-, IL-I, and TNF-induced Inflammatory Infiltrate. *American Journal of Pathology*. 1991; 138: 1485-96.

Venihaki M, Dikkes P, Carrigan A, Karalis KP. Corticotropin-releasing hormone regulates IL-6 expression during inflammation. *J. Clin. Invest*. 2001 ;108 :1159–66.

Vieira RP. Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos [tese] São Paulo : Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo ; 2007.

Vieira RP, Claudino RC, Duarte AC, Santos AB, Perini A, Faria Neto HC, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176:1-7.

Vinhadeli M. (Tribunal de Contas do Distrito Federal) Representação nº 33/07 – CF. Contratação de Leitos de Unidade de Terapia Intensiva – UTI em hospitais privados. Diversos ofícios oriundos do MPjTCDF. Evolução dos gastos com contratação de serviços de saúde. Brasília: TCDF; 2008. Relatório Técnico. Processo nº 4129/08B, 417-29.

Wolters PJ, Wray C, Sutherland RE, Kim SS, Koff J, Mao Y, Frank JA. Neutrophil-Derived IL-6 Limits Alveolar Barrier Disruption in Experimental Ventilator-Induced Lung Injury. *The Journal of Immunology.* 2009;182: 8056-62.

Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 Is an Antiinflammatory Cytokine Required for Controlling Local or Systemic Acute Inflammatory Responses. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 311-20.

Yang Y, Chen S, Ge X. Role of interleukin-18 in the development of acute pulmonary injury induced by intestinal ischemia/reperfusion and its possible mechanism. *Gastroenterology.* 2007; 22: 253-60.

Yao H, Yang SR, Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Adenuga D, Henry R, Edirisinghe I, Rahman I. Redox regulation of lung inflammation: role of NADPH oxidase and NF- κ B signalling. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35:1151-55.

Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *IMMUNOLOGY.* 2010; 3: 1- 6.

Wu CL, Lin L, Yang JS, Chan MC, Hsueh CM. Attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by treatment with IL-10. *Respirology.* 2009;14: 511–21.