Clarice Rosa Olivo

**O exercício aeróbio atenua a inflamação
pulmonar induzida pelo *Streptococcus
pneumoniae***

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

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Processos
Inflamatórios e Alérgicos
Orientador: Prof. Dr. Milton de Arruda
Martins

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Olivo, Clarice Rosa

O exercício aeróbio atenua a inflamação pulmonar induzida pelo Streptococcus pneumoniae / Clarice Rosa Olivo. -- São Paulo, 2015.

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

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientador: Milton de Arruda Martins.

Descritores: 1.Exercício 2.Streptococcus pneumoniae 3.Bactérias 4.Infecções pneumocócicas 5.Camundongos endogâmicos BALB C

©reprodução autorizada pelo autor

À minha família

Aos meus amigos

*A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém
ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

(Arthur Schopenhauer)

Agradecimentos

Aos meus pais que doaram todo esforço de uma vida para que, eu e minhas irmãs, pudéssemos crescer e nos tornarmos mulheres independentes, críticas e honestas. As minhas irmãs por estarem ao meu lado em todos os momentos.

Ao ProfºMilton A Martins por ter me orientado e permitido que eu pudesse fazer parte do LIm-20. E também pelo cuidado, pelo carinho e pela amizade.

A Dra Fernanda Lopes por ter sido peça fundamental não só deste trabalho como da minha vida.

Às Dra Eliane Miyaji e Dra Maria Leonor pela colaboração, atenção e paciência.

Aos alunos e amigos que colaboraram de muitas formas para que esta tese pudesse se tornar real: Juliana Lourenço, Rodrigo Medeiros, Francine Almeida, Petra Arantes.

Ao Davi Francisco e Fernanda Arantes por todo o companherismo, pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao Profº Rodolfo P. Vieira e a Rosana Paz pelo socorro na hora “apuro”.

À Dra Edna Leick e Camila Olivo pelas revisões.

Á Dra Beatriz M. Saraiva que me ensinou que: “Quem tem amigos tem TUDO.”

A todos os meus amigos (incluindo os supracitados) que me provaram que essa frase é verdade.

Essa Tese fecha um período da minha vida de muito esforço, de muita perseverança, mas muito mais que isso, de muito aprendizado.. E em todas as dificuldades surgiram pessoas prontas a estenderem suas mãos e me ajudaram a passar por todos os contrapempos dessa vida.

Obrigada a todos os amigos que fazem parte da minha vida....tenho certeza que nunca conseguirei agradecer, o suficiente, e muito menos retribuir tudo que vocês fizeram por mim.

Á vocês, meu eterno agradecimento.

Fernanda Lopes, Rodrigo Medeiros, Adenir Perini, Edna Leick, Milton Martins, Beatriz Saraiva, Fernanda Arantes, Rosana Paz, Carla Prado, Petra Arantes, Francine Almeida, Fabiola Zambon, Thayse Brugmann, Davi Francisco, Davi Sales, Cyntia Sales, Paula Calvão, Mariana Canceli, Rubia Rodrigues, Alessandra Choqueta, Rafael Reis, Felipe, Marcelo Aun, Adriana Palmeira, Annelize, Celso Carvalho, Rodolfo, Claudia Fló, Cristiane Battaglia, Cristiane, Priscila Sales, Fernanda Michels, Bárbara Oliveira, Katia, Francine Dias, Genai e a todos aqueles que me fazem mais feliz todos os dias.

E por fim, meu eterno e sempre companheiro: Frederico.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
1.1 O <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
1.2 Mecanismos de Defesa Respiratória.....	2
1.3 Atividade Física.....	6
1.4 Estresse Oxidativo.....	13
 2 OBJETIVO.....	 16
 3 MÉTODOS.....	 17
3.1 Desenho Experimental.....	17
3.2 Protocolo de Treinamento Físico Aeróbio.....	18

3.3 Linhagem da Bactéria e Condições de Crescimento Bacteriano.	19
3.4 Desafio Intranasal.....	20
3.5 Recuperação de Unidades Formadoras de Colônia (CFU) dos pulmões.....	20
3.6 Avaliação da Mecânica Pulmonar.....	20
3.7 Avaliação do Lavado Broncoalveolar (BAL).....	21
3.8 Histologia e Morfometria Pulmonar.....	22
3.9 Análise das Citocinas.....	22
3.10 Oxidantes/Antioxidantes.....	23
3.11 Análise Estatística.....	24
 4 RESULTADOS.....	 25
 5 DISCUSSÃO.....	 46
 6 CONCLUSÃO.....	 56
 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 57

Lista de Figuras

Figura 1: Figura do Modelo da Curva J.....	10
Figura 2: Figura representativa da Teoria Janela Aberta (<i>Open Window</i>)...	11
Figura 3: Linha do Tempo do Protocolo Experimental.....	18
Figura 4: Gráfico do Teste de Capacidade Física.....	25
Figura 5: Gráfico da Recuperação de CFU dos Pulmões 12 horas após a Administração de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	26
Figura 6: Gráfico da Recuperação de CFU dos Pulmões 24 horas após a Administração de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	27
Figura 7: Gráfico da Avaliação da Mecânica Pulmonar: Resistência do Sistema Respiratório – Fase Aguda.....	28
Figura 8: Gráfico da Avaliação da Mecânica Pulmonar: Elastância do Sistema Respiratório – Fase Aguda.....	29
Figura 9: Gráfico da Avaliação da Mecânica Pulmonar: Resistência do Sistema Respiratório – Fase Tardia.....	30
Figura 10: Gráfico da Avaliação da Mecânica Pulmonar: Elastância do Sistema Respiratório – Fase Tardia.....	31
Figura 11: Gráfico da Avaliação do Lavado Broncoalveolar – Fase Aguda.	32
Figura 12: Gráfico da Avaliação do Lavado Broncoalveolar – Fase Tardia.	33
Figura 13: Gráfico da Avaliação das Células Polimorfonucleares – Fase Aguda.....	34
Figura 14: Gráfico da Avaliação das Células Polimorfonucleares – Fase Tardia.....	35
Figura 15: Gráfico da Avaliação da Quimiocina KC no Homogenato	

Pulmonar – Fase Aguda.....	36
Figura 16: Gráfico da Avaliação das Citocinas TNF- α e IL-1 β no Homogenato Pulmonar – Fase Aguda.....	37
Figura 17: Gráfico da Avaliação da Citocina IL-6 no Homogenato Pulmonar – Fase Aguda.....	38
Figura 18: Gráfico da Avaliação da Quimiocina KC no Homogenato Pulmonar – Fase Tardia.....	39
Figura 19: Gráfico da Avaliação das Citocinas TNF- α e IL-1 β no Homogenato Pulmonar – Fase Tardia.....	40
Figura 20: Gráfico da Avaliação das Citocinas IL-6 no Homogenato Pulmonar – Fase Tardia.....	41
Figura 21: Gráfico da Expressão do Estresse Oxidativo no Parênquima Pulmonar 12 horas após a Administração de <i>Streptococcus pneumoniae</i> : CuZnSOD e MnSOD.....	43
Figura 22: Gráfico da Expressão do Estresse Oxidativo no Parênquima Pulmonar 12 horas após a Administração de <i>Streptococcus pneumoniae</i> : Gpx e gp91 ^{phox}	44
Figura 23: Gráfico da Expressão de iNOS no Parênquima Pulmonar 12 horas após a Administração de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	45

RESUMO

Olivo CR. O exercício aeróbio atenua a inflamação pulmonar induzida pelo *Streptococcus pneumoniae* [TESE]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

O treinamento aeróbio moderado tem sido reconhecido como um importante estimulador do sistema imune, no entanto o efeito deste na infecção bacteriana não tem sido extensivamente estudado. Nosso objetivo foi avaliar se o exercício aeróbio moderado prévio à infecção por *S. pneumoniae* influencia a resposta inflamatória pulmonar. Camundongos BALB/C foram divididos em 4 grupos: Controle (animais sedentários; não infectados); *S. pneumoniae* (animais sedentários e posteriormente infectados); Exercício (animais treinados; não infectados); Exercício + *S. pneumoniae* (animais treinados e posteriormente infectados). Os animais foram submetidos a um programa de treinamento físico aeróbio durante 4 semanas, e 72 horas após a última sessão de exercício, os animais receberam instilação nasal de *S. pneumoniae* (linhagem M10) e foram avaliados 12 horas (fase aguda) ou 10 dias (fase tardia) após a instilação. Na fase aguda, o grupo *S. pneumoniae* apresentou um aumento de: resistência e elastância do sistema respiratório, número total de células, neutrófilos, linfócitos e macrófagos no lavado broncoalveolar (BAL), células polimorfonucleares no parênquima pulmonar e TNF- α e IL-1 β no homogenato pulmonar. O exercício físico atenuou significativamente esses parâmetros. Além disso, o exercício físico resultou em aumento da expressão de enzimas antioxidantes no pulmão (CuZnSOD and MnSOD). Na fase tardia, o grupo Exercício + *S. pneumoniae* apresentou redução no número total de células e macrófagos no BAL, células polimorfonucleares no parênquima

pulmonar e IL-6 no homogenato pulmonar comparado ao grupo *S. pneumoniae*. Nossos resultados sugerem um efeito protetor do exercício aeróbio moderado contra a infecção bacteriana pulmonar. Esse efeito é provavelmente secundário ao efeito do exercício no balanço oxidante-antioxidante.

Descritores: Exercício Aeróbio; *S. pneumoniae*, bactéria, infecção pulmonar, camundongos.

SUMMARY

Olivo CR. Aerobic exercise attenuates pulmonary inflammation induced by *Streptococcus pneumoniae* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Moderate aerobic exercise training has been recognized as an important stimulator of the immune system, but its effect on bacterial infection has not been extensively studied. Our aim was to determine whether moderate aerobic exercise training prior to *S. pneumoniae* infection influences pulmonary inflammatory responses. BALB/c mice were divided into 4 groups: Control (sedentary without infection); *S. pneumoniae* (sedentary with infection); Exercise (aerobic training without infection); Exercise + *S. pneumoniae* (aerobic training with infection). Animals underwent aerobic exercise training for 4 weeks. 72 h after last exercise training, animals received a challenge with *S. pneumoniae* (strain M10) and were evaluated either 12 h (acute phase) or 10 days (late phase) after instillation. In acute phase, *S. pneumoniae* group had an increase in respiratory system resistance and elastance; number of total cells, neutrophils, lymphocytes and macrophages in bronchoalveolar lavage fluid (BAL); polymorphonuclear cells in lung parenchyma; and levels of TNF- α and IL-1 β in lung homogenates. Exercise training significantly attenuated the increase in all of these parameters. In addition, exercise induced an increase in expression of antioxidant enzymes (CuZnSOD and MnSOD) in lungs. In late phase, Exercise + *S. pneumoniae* group exhibited a reduction in number of total cells and macrophages in BAL, in polymorphonuclear cells in lung parenchyma and in levels of IL-6 in lung homogenates compared to *S. pneumoniae* group.

Our results suggest a protective effect of moderate exercise training against respiratory infection with *S. pneumoniae*. This effect is most likely secondary to an effect of exercise on oxidant-antioxidant balance.

Descriptors: Aerobic Exercise, *S. pneumoniae*, bacteria, lung infection, mice.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A pneumonia bacteriana ainda é uma importante causa de morbidade e de mortalidade no mundo, e o *Streptococcus pneumoniae* é um dos patógenos mais frequentemente isolados nos casos de pneumonia adquirida na comunidade (Armstrong et al., 1999; Mandell et al., 2007). Muito embora, desde o ano 2000, crianças e adolescentes já tenham sido imunizados com vacina contra o pneumococo, esse patógeno continua sendo o agente mais comum e letal que causa pneumonias, tanto em pacientes ambulatoriais quanto naqueles internados. Além do fato de estar associado a uma alta morbidade, mortalidade e aumento de gastos com cuidados médicos, principalmente em idosos (File & Marrie, 2010; Pletz et al., 2012; Welte et al., 2012; Wroe et al., 2012).

Estima-se que a infecção pneumocócica cause aproximadamente 2 milhões de mortes no mundo e custe 100 bilhões de dólares por ano (Dockrell et al., 2012). No Brasil, estima-se que no ano de 2014 ocorreram aproximadamente 640.000 internações por pneumonia (Datasus). A incidência da pneumonia pneumocócica é maior nas idades mais avançadas e em indivíduos com alguma comorbidade (Dockrell et al., 2012).

1.1 O *Streptococcus pneumoniae*

O *S. pneumoniae* é uma espécie de bactéria encapsulada Gram-positiva, com forma de diplococo, que se dispõe em pares ou cadeias. É anaeróbio facultativo e pertencente ao grupo α -*streptococci* (Bartlett et al., 2000). O principal fator que tem sido reconhecido de virulência do pneumococo

é a capsula de polissacarídeo, que proporciona à bactéria um mecanismo de variação antigênica e confere a especificidade do sorotipo (File & Marrie, 2010; Pletz et al., 2012; Welte et al., 2012; Wroe et al., 2012). A propensão de determinados tipos capsulares (sorotipos) para colonizar a nasofaringe tem sido associada ao tamanho e estrutura da cápsula (Weinberger et al., 2009), assim como às condições de nutrição local (Hathaway et al., 2012).

Essa bactéria frequentemente coloniza a nasofaringe e, a partir daí, pode se espalhar diretamente pelas vias aéreas para o trato respiratório inferior, causando pneumonia, ou para os seios da face ou ouvido, causando outras morbidades. Além disso, pode penetrar na superfície epitelial celular causando uma infecção local ou bacteremia. A pleura e as meninges também podem ser infectadas por contiguidade (Dockrell et al., 2012).

1.2 Mecanismos de Defesa Respiratória

Quando os patógenos que colonizam as vias aéreas conseguem ultrapassar barreiras estruturais de defesa, podem causar pneumonia (Knapp et al., 2005). A bactéria pode invadir o trato respiratório inferior pela aspiração de organismos da orofaringe, inalação de aerossóis contendo bactérias ou, menos frequentemente, por via hematogênica, vinda de outro local do corpo.

A defesa normal do pulmão inclui a resposta imune inata e adquirida. O sistema imune inato consiste em defesas estruturais, moléculas antimicrobianas geradas nas vias aéreas, fagocitose pelos macrófagos alveolares residentes e recrutamento das células polimorfonucleares (PMN), e é a primeira resposta para a eliminação de bactérias patogênicas do espaço alveolar. Já a resposta imune adquirida consiste em resposta antígeno-específica celular e anticorpo-mediada pela resposta imune e está envolvida na erradicação do patógeno encapsulado, assim como daqueles patógenos sobreviventes após a fagocitose (Sibille & Reynolds, 1990).

Assim, logo após a invasão dos microrganismos, a resposta é imediata: os macrófagos alveolares rapidamente fagocitam e são responsáveis pela morte da bactéria. Tal mecanismo é essencial para a eliminação diária de bactérias e manutenção da esterilidade da superfície alveolar.

Esse reconhecimento feito pelos macrófagos alveolares residentes se dá através de receptores do tipo *toll-like* (TLR) (Wang et al., 2002). Estes receptores são proteínas localizadas na região transmembrana com um importante papel na detecção e reconhecimento de patógenos e indução da atividade antimicrobiana, tanto do sistema imune inato quanto do adquirido (Takeda et al., 2003; Takeda & Akira, 2004). Dos 11 receptores TLR descritos, TLR-2 e -4 são os mais estudados como sendo de grande importância nas infecções bacterianas e têm sido empregados em modelos experimentais de pneumonia (Branger et al., 2004).

Esses receptores, por sua vez, ativam fatores de transcrição, como o NF- κ B (Akira et al., 2006), que regulam a expressão de mediadores pró-inflamatórios como citocinas/quimiocinas e moléculas de adesão que, por sua vez, induzem a infiltração neutrofílica e ativam estas células para aumentar a liberação de citocinas e quimiocinas, na tentativa de conter o patógeno (Sporri et al., 2008).

No entanto, em eventos em que o patógeno é muito virulento ou a carga de bactérias é muito grande para ser contida apenas pelos macrófagos alveolares, essas células são capazes de gerar inúmeros mediadores que ajudam a recrutar um grande número de células PMN dos vasos pulmonares para o espaço alveolar (Ozaki et al., 1989; Sibille & Reynolds, 1990). Dentre esses mediadores inflamatórios, estão os fatores quimiotáticos de neutrófilos como KC (citocina indutora de neutrófilo, CXCL-1) e a proteína inflamatória de macrófago-2 (MIP-2) (Bergeron et al., 1998). Tal recrutamento providencia ainda um aumento auxiliar na fagocitose, o que é essencial para a erradicação do patógeno (Ozaki et al., 1989; Sibille & Reynolds, 1990).

A importância dessas células pode ser demonstrada em estudos como o de Knapp et al. (2003) que, em um modelo experimental de pneumonia, encontrou uma diminuição da sobrevivência dos animais que apresentavam menor quantidade de macrófagos antes da inoculação de *S. pneumoniae* e um aumento do recrutamento de células PMN. Semelhante resultado obtiveram Dockrell et al. (2003), porém sugeriram que os macrófagos são importantes na fagocitose de células em infecções pneumocócicas de baixa dose, enquanto os PMN são mais importantes em infecções com alta carga de bactéria.

Assim, a ativação dos neutrófilos é importante tanto no clearance do pneumococo como na resolução da pneumonia (Kolling et al., 2001). Isso se deve às atividades específicas dessa célula, que incluem aderência à parede dos vasos, quimiotaxia, fagocitose e morte de bactérias. A resposta imune inata aumenta a produção de neutrófilos pela medula óssea, encurtando o tempo de maturação e estimulando a sua liberação para a circulação (Lawrence et al., 1996).

Além disso, essas células precisam se comunicar com os outros componentes do sistema imune inato, a fim de organizar melhor a resposta do hospedeiro. Entre os componentes desse sistema que ajuda a localizar, reforçar e resolver essas invasões, estão as citocinas (Standiford et al., 1996). As principais citocinas consideradas de fase inicial em resposta à invasão microbiana são o TNF- α e a IL-1 β . Essas citocinas amplificam, propagam e coordenam os sinais pró-inflamatórios, resultando na expressão de moléculas efetoras responsáveis por mediar diversos aspectos da imunidade inata (Mehrad & Standiford, 1999). Ambas promovem o aumento da expressão de quimiocinas e moléculas de adesão, além de serem essenciais no recrutamento de neutrófilos da circulação sanguínea.

O TNF- α , é conhecido como uma citocina de alarme e é rapidamente produzido, seguindo tanto um estímulo antígeno-específico como não específico (Nelson et al., 1989). Em um estudo em que os animais foram desafiados com LPS por via intratraqueal, observou-se um rápido aumento dessa citocina nos pulmões desses animais (Nelson et al., 1989). Já a neutralização desse desafio usando anti- TNF- α suprimiu o fluxo de PMN para as vias aéreas (Nelson et al., 1991; Kolls et al., 1995). Além disso, em um modelo experimental de pneumonia por *S. pneumoniae*, a supressão do TNF- α resultou em aumento no crescimento dessa bactéria no pulmão e os animais tratados morreram mais cedo que os controles (Takashima et al., 1997).

Já a IL-1 β pode ser considerada uma citocina com funções semelhantes ao TNF- α . Ela parece agir no sentido de facilitar a infiltração de leucócitos para o local da inflamação, para então se iniciar uma cascata de reações resultando na liberação de mediadores inflamatórios responsáveis por manter e propagar a resposta inflamatória (Dinarello, 1996). A falta dessa interleucina ou dos seus

sinais moleculares promove um aumento na suscetibilidade a infecções (Horino et al., 2005; Van Rossum et al., 2005). No entanto, sua produção local e sistêmica excessiva pode exacerbar de forma negativa os resultados de uma infecção bacteriana grave (Van der Poll & Van Deventer, 1999). Ainda assim, ambas citocinas (TNF- α e IL-1 β) induzem quimiocinas como a KC, através do sistema NF-kB (Li & Verma, 2002), que são necessárias e suficientes para o recrutamento neutrofílico. Na deficiência de ambas, o recrutamento neutrofílico diminui significativamente (Jones et al., 2005).

Muitas outras citocinas estão envolvidas na defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores, como por exemplo, a IL-6, que tem sido descrita tanto como anti como pró-inflamatória. Ela parece retardar a apoptose dos neutrófilos e melhorar a sua função, incluindo a produção de radicais de oxigênio (Biffl et al., 1996), além de influenciar no mecanismo de resposta imune adquirida (Barton, 1997). A IL-6 é uma citocina frequentemente detectada na circulação de pacientes com infecções bacterianas (Hack et al., 1989), incluindo aqueles com pneumonia (Dehoux et al., 1994). Durante a pneumonia, a IL-6 é, pelo menos em parte, produzida no local da infecção, uma vez que foi encontrada no lavado broncoalveolar (BAL) de pacientes com pneumonia unilateral apenas no lado infectado dos pulmões (Dehoux et al., 1994). Estudos clínicos também têm associado altos níveis de IL-6 à prevalência de falência de múltiplos órgãos e mortalidade na sepse (Andaluz-Ojeda et al., 2012; Lichtenstern et al., 2012). Além disso, Sossdorf et al. (2013) encontraram aumento dessa citocina em animais nos quais a sepse foi induzida.

Bergeron et al. (1998) estudaram a cinética do *S. pneumoniae* em um modelo experimental de pneumonia em camundongos. Observaram que a primeira citocina a ser recuperada no BAL foi a TNF- α , que junto com a IL-1, atingiram seu pico em 12 horas pós-instilação tanto no BAL como nos pulmões, reduzindo seus níveis logo após. Embora a IL-6 pareça ter comportamento semelhante, ela se mostrou associada ao aumento tardio até a morte dos animais, o que foi correlacionado com bacteremia. Já Ferreira et al. (2009) analisaram 2 linhagens diferentes de *S. pneumoniae*. Enquanto naqueles que receberam a linhagem mais branda, tanto o TNF- α como o IL-6 tiveram um

rápido aumento atingindo seu pico de expressão entre 6 a 12 horas, diminuindo logo em seguida, na linhagem mais nociva, embora os níveis de TNF- α não tenham aumentado tão rapidamente, eles foram mantidos até 36 horas, tempo em que a infecção parecia estar fora de controle. Com isso, percebe-se que embora a produção local de mediadores inflamatórios seja essencial na defesa do hospedeiro durante a infecção, a sua produção excessiva, de forma sistêmica, causa falência e morte dos animais (Knapp et al., 2005).

Embora vários modelos experimentais sejam utilizados para esclarecer os mecanismos da patogênese da doença causada pelo *S. pneumoniae*, o modelo com camundongos tem sido o que mais se destaca por ser de fácil manipulação e reprodutibilidade dos dados. Esse modelo permite a análise de diferentes parâmetros, incluindo sobrevivência após infecção, a presença de bactérias no sangue e nos pulmões, níveis de inflamação e análise histológica do tecido pulmonar (Chiavolini et al., 2008). No entanto, percebe-se que os conhecimentos acerca dos mecanismos de prevenção, do tratamento e até mesmo fisiopatológicos da pneumonia pneumocócica são, ainda, limitados, justificando este projeto de pesquisa.

1.3 Atividade Física

Nos dias de hoje, calcula-se que o sedentarismo associado a uma dieta inadequada seja responsável por 15% das mortes nos EUA, e o rápido aumento na prevalência do sobrepeso sugere que esse número aumente nos próximos anos (Mokdad et al., 2004).

Tanto as obesidades como o sedentarismo levam a um aumento da gordura visceral, que é acompanhada pela infiltração de células pró-inflamatórias do sistema imune, levando a um estado constante de inflamação sistêmica de baixo grau. Esse, por sua vez, está associado ao desenvolvimento de resistência à insulina, aterosclerose, neurodegeneração e crescimento tumoral (Pradhan et al., 2001; Pedersen & Saltin, 2006; Leonard, 2007).

Da mesma forma, há evidências de que o exercício físico melhore o sistema imune (Kohut & Senchina, 2004). Os efeitos benéficos da atividade física regular não-exaustiva têm sido estudados há muito tempo. Existe uma

irrefutável evidência da efetividade da atividade física regular na prevenção primária e secundária de algumas doenças crônicas como o diabetes, o câncer, a hipertensão e a depressão (Warburto et al., 2006). De uma maneira altamente específica, influenciada pelo modo e pela sua duração, entre outros fatores, a atividade física gera um desvio adaptativo na homeostase orgânica, o que conduz a uma reorganização da resposta de diversos sistemas, incluindo o sistema imune (Malm, 2004).

Estudos recentes têm sugerido três possíveis mecanismos para explicar as propriedades anti-inflamatórias do exercício: redução da massa visceral gorda, aumento da produção e liberação de citocinas anti-inflamatórias advindas da contração do músculo esquelético (as miocinas) (Petersen & Pedersen, 2005; Flynn & McFarlin, 2006; Maethur & Pedersen, 2008; Pedersen & Febbraio, 2008) e redução da expressão dos receptores do tipo Toll (toll-like receptors) nos monócitos e macrófagos (Flynn & McFarlin, 2006). Estudos em animais têm proposto outros mecanismos, como a inibição da infiltração de monócitos e macrófagos no tecido adiposo e mudança de fenótipo dos macrófagos dentro do tecido adiposo (Kawanishi et al., 2010).

O exercício físico aumenta a energia gasta e ajuda a reduzir a gordura corporal que estaria acumulada em indivíduos que consomem mais calorias do que necessitam. Nesse sentido, o exercício reduz o risco de desenvolvimento de obesidade e adiposidade excessiva, além de melhorar o perfil lipídico do sangue através da diminuição da concentração de triglicérides e de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e aumentar a concentração das lipoproteínas de alta densidade (HDL). No entanto, o efeito anti-inflamatório do exercício não se dá apenas pela redução da massa visceral e consequente diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo, mas também pela indução de um ambiente anti-inflamatório.

A redução da massa gorda visceral e da circunferência abdominal com a atividade física regular, mesmo sem perda de peso, traz inúmeros benefícios ao indivíduo (Ross & Bradshaw, 2009). Com a diminuição da quantidade de gordura abdominal, há uma consequente redução na inflamação sistêmica através da redução da expressão de adipoquinas pró-inflamatórias (Yudkin, 2007).

Além disso, durante e após a atividade física, a musculatura esquelética ativa aumenta expressivamente os níveis celular e circulante de IL-6 (Pedersen, 2004). Esse aumento é transitório e normalmente retorna a valores basais 1 hora após o término do exercício. No entanto, essa interleucina parece ser responsável pelo subsequente aumento dos níveis circulantes de IL-10 e IL-1ra – citocinas anti-inflamatórias – além da liberação de cortisol das glândulas adrenais (Stensberg et al., 2003). A IL-1ra parece inibir a ação inflamatória da IL-1 β , enquanto que a IL-10 parece diminuir a regulação da resposta imune adquirida, além de diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, promovendo um estado anti-inflamatório (More et al., 2001; Maynard & Weaver, 2008).

Já ativação da sinalização dos TLRs resulta em aumento da expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias e, com isso, tem um importante papel na mediação da inflamação sistêmica (Takeda et al., 2003). Alguns estudos sugerem que a atividade física possa atenuar o processo inflamatório através da diminuição da expressão desses receptores (Lancaster et al., 2005; Gleeson et al., 2006).

Com isso, parece claro que a atividade física de uma forma geral melhora o sistema imune, e conseqüentemente, confira aos indivíduos praticantes um menor risco de desenvolverem doenças relacionadas com a idade, assim como menor suscetibilidade a contrair infecções bacterianas ou virais (DiPenta et al., 2004; Kohut & Senchina, 2004).

Matthews et al. (2002) demonstraram que a prática de 2 horas de exercício moderado por dia é associada à diminuição de 29% do risco de o indivíduo ter infecção das vias aéreas superiores, quando comparado com indivíduos sedentários. Ao mesmo tempo, já foi demonstrado um possível aumento da atividade das células “*natural killer*” (NK) em atletas, quando comparados a não atletas (Nieman, 1997), sugerindo que o exercício moderado pode estar associado à melhora na função dos linfócitos T ou B (Kohut et al., 2001).

Ainda assim, Jankord & Jemiolo (2004) mostraram que a atividade aeróbia de intensidade moderada a alta, realizada de maneira sistemática, pode exercer um papel vital no controle inflamatório, modulando a produção de

citocinas envolvidas neste processo. Na mesma linha, Woods et al. (1999) observaram que o treinamento físico supervisionado desencadeou aumento de células CD4+, CD8+ e linfócitos T “naïve”, sugerindo que o condicionamento físico possa efetivamente modular o tipo de resposta imune.

Já Kohut et al. (2001) compararam a resposta imune de camundongos jovens e idosos que receberam treinamento físico e foram infectados (24 horas após a última sessão de exercício) com vírus da herpes tipo 1 (intranasal, para simular uma infecção de via aérea superior – após a infecção nenhum animal se exercitou por 7 dias). Após 8 semanas de exercício físico moderado, observaram melhora na resposta imune específica à infecção em animais idosos, com aumento da resposta Th1. Mais tarde, Kohut et al. (2009) também avaliaram camundongos infectados com vírus da influenza após 3 meses e meio de exercícios, e encontraram diminuição dos sintomas, carga viral e níveis de citocinas inflamatórias e quimiocinas nesses animais, quando comparados aos controles.

Lowder et al. (2005) demonstraram que atividade física moderada por 4 dias, iniciada logo após a infecção pelo vírus da influenza, aumentou a sobrevivência de camundongos BALB/c. Já Cannon & Kluger (1984), demonstraram que o treinamento físico moderado em camundongos encontrava-se associado à redução na mortalidade causada por infecção bacteriana com *Salmonella typhimurium*, embora nenhuma medida referente à resposta imune tenha sido feita.

Da mesma forma, em um protocolo de 1 hora de exercícios moderados, realizados por 6 dias antes da infecção por HSV-1, Davis et al. (2004) encontraram uma redução de 45% na morbidade e 38% na mortalidade dos animais submetidos à atividade física quando comparados aos sedentários.

Ilbäck et al. (1991) submeteram duas linhagens de ratos a um protocolo de natação imediatamente antes e depois da indução à infecção por *S. pneumoniae* ou com *Francisella tularensis*. O exercício exaustivo imediatamente antes da inoculação com ambas as bactérias reduziu drasticamente a mortalidade nas duas linhagens de ratos utilizadas, enquanto que o exercício realizado logo após a inoculação aumentou a mortalidade dos animais.

Esses estudos sugerem que a atividade física moderada exerce um papel benéfico sobre o sistema imune. No entanto, esses mesmos benefícios parecem não existir quando o exercício é realizado de uma forma exaustiva (Amstrong et al., 1983). O conceito de que o exercício pode ter efeitos tanto positivos quanto negativos no que diz respeito à infecção tem sido reconhecido há pelo menos 2 décadas, quando propôs-se um modelo de risco de infecção das vias aéreas superiores em forma de curva “J” (Figura 1), que muda em função da intensidade do exercício. Dessa forma, pessoas que praticam exercícios regulares de moderada intensidade apresentam menor risco de contrair infecções de trato respiratório superior, comparado a pessoas sedentárias ou que praticam exercícios de alta intensidade e de longa duração (Nieman, 1994).

Fonte: Nieman DC., 1994.

Figura 1: Figura do modelo de curva em forma de J que representa a relação entre a quantidade de exercício e o risco de infecção de vias aéreas superiores. Este modelo sugere que o exercício moderado tenha um baixo risco desse tipo de infecção, enquanto que a grande quantidade de exercício aumenta esse risco.

Desta forma, o exercício, quando realizado por período prolongado e/ou de forma exaustiva, pode ter um efeito depressivo temporário sobre o sistema imune, o que está associado a um aumento de incidência de infecções nas

semanas seguintes ao evento. Este tipo de exercício é acompanhado por respostas que são similares, em muitos aspectos, àquelas vistas durante a infecção, sepse ou trauma (Gleeson, 2007). Há um aumento no número de leucócitos circulantes (principalmente linfócitos e neutrófilos), relacionado à magnitude da intensidade e à duração do exercício. Também é observado um aumento no número de várias substâncias no plasma, que influenciam nas funções dos leucócitos, como IL (interleucina)-6, IL-10 e o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra). No entanto, a produção de IL-6 (produzida pelos monócitos), IL-2 e INF (interferon)- γ é inibida durante e por algumas horas após o exercício prolongado (Gleeson, 2007).

Essas alterações diminuem a capacidade do sistema imune em promover a defesa contra microrganismos invasores. Além disso, ainda têm-se discutido que essa imunossupressão após uma maratona, por exemplo, proporciona o que podemos chamar de “janela aberta” ou “*open window*” (Figura 2), período no qual os indivíduos estariam mais propensos a contrair infecções, tanto bacterianas, quanto virais (Nieman, 2007).

Fonte: Nieman DC; 2007.

Figura 2: Figura representativa da teoria da “janela aberta” (*open window*). Exercícios moderados causam mudanças brandas no sistema imune; em contraste, exercícios prolongados, como maratonas, levam a uma disfunção imune, que aumenta a probabilidade de infecções respiratórias de vias aéreas superiores oportunistas

Já em 1983, Peters & Bateman relataram o aumento do risco de infecções respiratórias de trato superior durante as 2 semanas após as ultramaratonas de Capetown e de Pretória e, ainda, tais infecções seriam mais comuns em corredores rápidos do que nos lentos. Corroborando com tais resultados, Nieman et al. (1990) acompanharam atletas antes e após a maratona de Los Angeles e 40% dos atletas relataram pelo menos 1 episódio de infecção de vias aéreas superiores no período de 2 meses de inverno anterior à maratona e 12,9%, na semana seguinte à maratona.

Gleeson et al. (2011) acompanharam indivíduos que realizavam atividade física durante 4 meses e os classificaram conforme o volume de treino: 3-6 horas por semana (baixo); 7-10 horas/semana (médio) e 11 horas ou mais/semana (alto). Os dois últimos grupos apresentaram mais episódios de infecção do trato respiratório superior do que o primeiro, sugerindo uma conexão entre o volume de treinamento e a suscetibilidade a infecções respiratórias de trato superior.

Além disso, estudos experimentais também relatam um aumento da sensibilidade a infecções após exercícios de alta intensidade. Murphy et al. (2008) submeteram camundongos a um protocolo de exercício intenso por 3 dias, previamente à instilação intranasal do vírus da influenza. Ao final, os animais que realizaram atividade física apresentaram maior morbidade, mortalidade e sintomatologia relacionada ao vírus do que os animais controle, corroborando com estudos que sugerem que o exercício de alta intensidade pode aumentar a suscetibilidade a infecções.

Dessa forma, os estudos sugerem que os efeitos do exercício sobre a regulação do sistema imune sejam altamente específicos, influenciados pelo modo e duração do exercício, pelas características do sujeito, pelo ambiente entre outros fatores, e conduzem a uma reorganização da resposta de diversos sistemas, incluindo o sistema imune (Malm, 2004).

Assim, de uma forma geral, observa-se que a atividade física moderada influencia de alguma forma o sistema imune, o que poderia, por consequência, fornecer uma proteção contra a pneumonia bacteriana, embora ainda existam poucos estudos que avaliem o papel da atividade física no desenvolvimento da infecção em geral e especificamente do *S. pneumoniae*.

1.4 Estresse Oxidativo

O organismo humano tem um elaborado sistema antioxidante que age para neutralizar os radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS), com a finalidade de manter a homeostase. No entanto, se houver um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, ocorre o que chamamos de estresse oxidativo (Gutteridge & Halliwell, 2000), caracterizado pela geração excessiva de ROS e nitrogênio (RNS) e reduzida capacidade antioxidante (Campos et al., 2013). Este mecanismo está diretamente relacionado com a oxidação de proteínas, do DNA e de lipídios, o que pode levar à injúria pulmonar ou induzir uma variedade de respostas, que podem levar à geração secundária de espécies reativas (Gutteridge & Halliwell, 2000).

ROS e RNS são classes de moléculas reativas que, para adquirirem sua estabilidade, tendem a doar ou “roubar” elétrons de outras moléculas, como os lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos e, usualmente, resultam em remodelamento estrutural destas moléculas alvo. ROS e RNS podem atuar em conjunto ou serem oponentes, dependendo da concentração, localização e do contexto. Os níveis tanto de ROS como de RNS, são essenciais para o nosso bem-estar, tendo vários papéis regulatórios nas células. Por exemplo, as ROS são produzidas por células imunes (macrófagos e neutrófilos), durante a queima respiratória, para eliminar antígenos (Freitas et al., 2010). Também podem servir como sinalizadores para fatores de transcrição, diferenciação e desenvolvimento, assim como estimuladores para aumento da expressão de enzimas antioxidantes (Powers et al., 2001; Sen et al., 2010).

Além disso, acredita-se que um dos principais mecanismos de defesa contra os microrganismos, como o *S. pneumoniae*, é mediado pelos neutrófilos, através da liberação de ROS (Seegal et al., 2000). Marriot et al. (2008), demonstraram em animais deficientes em gp91^{phox}, que receberam *S. pneumoniae*, que as ROS derivadas do sistema NADPH oxidase regulam a resposta inflamatória, mas não a morte microbiana. Pollock et al. (1995), observaram um aumento na suscetibilidade à infecção por *Staphylococcus aureus* e *Aspergillus fumigatus* em animais *knockout* para esta mesma

subunidade do complexo NADPH (gp91^{phox}). Com isso, podemos perceber que o sistema oxidante-antioxidante pode ser uma peça central no processo inflamatório gerado a partir de um processo infeccioso.

Embora estudos também tenham demonstrado que a atividade física possa aumentar a produção de espécies reativas e radicais livres (Gomes, Silva & Oliveira, 2012), esse aumento parece levar a uma adaptação favorável do organismo, uma vez que já é bem documentado que o exercício aeróbio causa aumento da atividade enzimática antioxidante em vários tecidos (Kanter, 1998; Wilson & Johnson, 2000; Gomez-Cabrera et al., 2008). Esse processo adaptativo ocorre por causa dos radicais livres produzidos durante a contração muscular, que age como sinalizador de moléculas que estimula a expressão de gene e, por isso, aumenta a expressão de enzimas antioxidantes e modula outras vias de proteção contra o estresse oxidativo (Radák et al., 2003; Gomez-Cabrera et al., 2008), reforçando o sistema antioxidante do organismo, minimizando o processo oxidativo (Gomez-Cabrera et al., 2008).

Assim, estudos têm sido conduzidos no sentido de mostrar o aumento da expressão de enzimas antioxidantes, em vários tecidos, induzido pelo exercício físico. Avula & Fernandes (1999) e Avula et al. (2001) demonstraram que a ação antioxidante endógena aparece aumentada em camundongos que fizeram tanto atividade física voluntária como forçada. Já Gündüz et al. (2004) observaram que ratos idosos que nadaram por mais de um ano apresentaram aumento das enzimas superóxido dismutase nos pulmões e coração, catalase no fígado e glutathione peroxidase nos três tecidos (Hoffman-Goetz et al., 2008). Toledo et al. (2012), também encontraram aumento da Gpx em animais submetidos à atividade física moderada em um modelo experimental de exposição à fumaça de cigarro. Embora essa exposição tenha reduzido a expressão da enzima CuZnSOD, o exercício físico inibiu essa redução.

Desta forma, podemos concluir que, embora a atividade física pareça aumentar o estresse oxidativo, esse aumento parece ser transitório e necessário para que ocorra o aumento da produção de enzimas antioxidantes a longo prazo.

Com isso, nossa hipótese para este estudo experimental foi a de que os animais submetidos ao protocolo de atividade física moderada iriam apresentar

uma resposta inflamatória atenuada, tanto em uma fase aguda quanto em uma fase mais tardia, devido a um aumento da produção de agentes antioxidantes em comparação aos oxidantes.

2 OBJETIVO

Nosso objetivo foi avaliar se o exercício aeróbio atenua o processo inflamatório pulmonar em camundongos submetidos à infecção pulmonar induzida pelo *Streptococcus pneumoniae*.

3 MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil) (Processo nº 0275/09). Todos os animais (camundongos machos BALB/C) desse estudo foram provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da USP e receberam cuidados de acordo com o “Guia de cuidados e uso de animais de laboratório (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals – National Research Council on the National Academies*)”.

3.1 Desenho Experimental

Camundongos machos BALB/C (20-25g) foram randomicamente divididos em 4 grupos:

- ✓ grupo **Controle**: animais que permaneceram sedentários e não receberam instilação de bactérias;
- ✓ grupo **Exercício**: animais submetidos a um protocolo de atividade física aeróbia e que não receberam instilação de bactéria;
- ✓ grupo ***S. pneumoniae***: animais que permaneceram sedentários e receberam instilação intranasal de *S. pneumoniae*;
- ✓ grupo **Exercício + *S. pneumoniae***: animais submetidos a um protocolo de atividade física aeróbia e que receberam instilação intranasal de *S. pneumoniae*.

Foram realizados 2 protocolos experimentais:

Fase Aguda: os animais foram estudados **12 horas** após a instilação intranasal de *S. pneumoniae* (Grupo Controle: n=7; grupo Exercício: n=7; grupo *S. pneumoniae*: n=8; grupo Exercício + *S. pneumoniae*: n=8).

Fase Tardia: os animais foram estudados **10 dias** após a instilação intranasal de *S. pneumoniae* (Grupo Controle: n=7; grupo Exercício: n=7; grupo *S. pneumoniae*: n=8; grupo Exercício + *S. pneumoniae*: n=8)

Figura 3: Linha do Tempo do Protocolo Experimental

Em ambos protocolos experimentais, para os grupos submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio, este foi cessado 72 horas antes da instilação intranasal de bactérias (Figura 3).

3.2 Protocolo de Treinamento Físico Aeróbio

Foi realizado em esteira ergométrica adaptada para camundongos (modelo KT 400, marca Imbramed®, RS, Brasil), por um período de 4 semanas. Na semana anterior ao período de treinamento, os animais foram submetidos a uma adaptação na esteira ergométrica, onde os animais permaneceram correndo por 5 minutos a uma velocidade de 0,2 Km/h, durante 3 dias. Vinte e

quatro horas após o 3º dia de adaptação, todos os animais foram submetidos a um teste de capacidade física máxima individual com sucessivos aumentos da velocidade da esteira ergométrica (0,1 km/h a cada 2,5 minutos, 25% inclinação) até a exaustão do animal (velocidade na qual os animais não conseguiam permanecer correndo mesmo após estímulos mecânicos gentis). A velocidade de treinamento foi calculada como 50% da velocidade máxima atingida por cada animal no teste de esforço. O treinamento foi realizado 5 vezes por semana, 60 minutos por sessão (25% de inclinação), durante 4 semanas. Ao final deste período, o teste físico foi repetido com o intuito de reavaliar o condicionamento físico dos animais. Ressaltamos que a adaptação na esteira e o teste de capacidade física máxima inicial e final foram aplicados em todos os grupos experimentais com o intuito de avaliar se o treinamento físico foi capaz de melhorar o condicionamento físico dos animais (Vieira et al., 2007).

3.3 Linhagem da Bactéria e Condições de Crescimento Bacteriano

Os estoques isolados de *S. pneumoniae* utilizados para os modelos de desafio em camundongos foram previamente semeados em placas de ágar-sangue e estocados em THY (extrato de levedura) contendo 20% de glicerol a uma temperatura de -80°C. Para obter os lotes de desafio, alíquotas desses estoques foram descongeladas e crescidas em THY até DO A_{600nm} = 0,4-0,6. As suspensões de bactérias foram então coletadas por centrifugação, alíquotadas e estocadas novamente a -80 °C. Antes de cada experimento de desafio, uma alíquota do lote foi descongelada, e diluições seriadas foram plaqueadas para então ser checado o número de CFUs (Unidades Formadoras de Colônia). Essas bactérias foram inoculadas em camundongos para testar a virulência de cada lote de bactéria (Ferreira et al., 2009).

3.4 Desafio Intranasal

Camundongos dos grupos infectados com *S. pneumoniae* foram anestesiados intraperitonealmente com 200 µL de uma mistura de 0,2% xilazina e 1,0% cetamina, para então serem desafiados com a linhagem M10 (10^6 CFU/animal), através da inoculação de 50 µL de uma suspensão de *Streptococcus pneumoniae* em 0,9% de salina, em uma narina do animal. Animais dos grupos controle não receberam qualquer desafio (Ferreira et al., 2009).

3.5 Recuperação de Unidades Formadoras de Colônia (CFU) dos pulmões

Animais dos grupos *S. pneumoniae* e Exercício + *S. pneumoniae* foram separados exclusivamente para que pudéssemos avaliar a quantidade CFU nos pulmões 12 horas (n=8 e n=8, respectivamente) e 24 hs (n=8 e n=7, respectivamente) após a inoculação intranasal de *S. pneumoniae*. Os pulmões desses animais foram coletados e macerados conforme descrito acima para análise das citocinas. Logo após, foram feitas diluições seriadas deste material para então serem semeados em placa de ágar-sangue. Tais placas foram incubadas durante a noite (37°C) para a CFU ser determinada. O limite para detecção foi de 100 CFU/animal no homogenato de pulmão (Ferreira et al., 2009).

3.6 Avaliação da Mecânica Pulmonar

Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com Tiopental (70 mg/kg), em seguida traqueostomizados, para então serem conectados a um ventilador para animais de pequeno porte (Harvard 683; Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA), com volume corrente de 10 mL/kg

e 150 respirações/minuto com a finalidade de realizar medidas de Resistência do Sistema Respiratório (Rrs) e Elastância (Ers). Resumidamente, a pressão traqueal (Ptr) foi medida com um transdutor de pressão diferencial (DP 45– 28– 2114; Validyne, Northridge, CA) conectado à cânula traqueal. O Fluxo ($\dot{V}$) foi medido por um pneumotacógrafo (Fleisch no. 4–0) conectado à cânula e ao transdutor de pressão diferencial. As mudanças no $\dot{V}$ foram obtidas pela integração eletrônica do volume. Os sinais de Ptr e $\dot{V}$ foram registrados e salvos em um computador. Nove a dez ciclos respiratórios foram usados em média para calcular um ponto de medida. Rrs e Ers foram obtidos usando a equação do movimento do sistema respiratório como a seguir:

$$Ptr(t) = Ers \cdot V(t) + Rrs \cdot \dot{V}(t), \text{ onde } t \text{ é tempo (Mortola e Noworaj, 1983).}$$

3.7 Avaliação do Lavado Broncoalveolar (BAL)

Após a avaliação da mecânica respiratória, uma incisão de 2 cm foi realizada no abdômen dos animais para exsanguinação através da secção da artéria aorta abdominal. Pela cânula traqueal, o BAL foi obtido através da lavagem das vias aéreas com 0,5 mL de salina estéril, repetida por 3 vezes. Para contagem de células totais e diferenciais, o BAL foi centrifugado a 800 rotações/minuto, a 5°C, por 10 minutos, as células depositadas foram resuspensas em 0,3 mL de salina estéril. O número total de células viáveis foi determinado usando a câmara de Neubauer. Foram confeccionadas lâminas de cytopspin (Cytospin, Cheshire, UK) e posteriormente coradas com Diff-Quick (Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ) para contagem diferencial das

células. Pelo menos 300 células foram contadas por lâmina (Ramos et al., 2010; Toledo et al., 2012; Vieira et al., 2012).

3.8 Histologia e Morfometria Pulmonar

Após a coleta do BAL, a caixa torácica anterior foi aberta, os pulmões removidos em bloco, fixados com 4% de formaldeído por 24 horas e submetidos a técnicas convencionais de histologia. Resumidamente, cortes dos pulmões foram incluídos em parafina, e foram obtidas fatias de 5 μm do material que a seguir foi corado com hematoxilina & eosina com a finalidade de se avaliar a densidade de células polimorfonucleares (PMN) no parênquima pulmonar.

A densidade de células PMN no parênquima pulmonar foi avaliada por morfometria convencional, utilizando-se um retículo com 100 pontos e 50 retas (técnica de contagem de pontos) e área conhecida ($62.400 \mu\text{m}^2$, aumento de 400x), acoplado à ocular de um microscópio óptico convencional (Weibel, 1963). Foram escolhidos 15 campos aleatórios do parênquima pulmonar para então ser feita a contagem do número de células na área do retículo, dividida pelo número de pontos que caíam no parênquima. Os resultados foram expressos em células por micrômetros quadrados (Ramos et al., 2010; Anciães et al., 2011; Gonçalves et al., 2012; Vieira et al., 2012).

3.9 Análise das Citocinas

Cinco animais de cada grupo foram randomicamente separados para avaliar exclusivamente os níveis de citocinas. Os pulmões desses animais foram coletados e rompidos em meia salina com o auxílio de um filtro de células. As amostras foram centrifugadas, e em seguida o sobrenadante foi estocado a -80°C para subsequente análise das citocinas. Os níveis de

interleucina (IL)-1 β , IL-6, Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α e Quimiocina derivada de Queratinócitos (KC – Keratinocyte-derived Chemokine) foram medidos utilizando-se o kit comercial de Elisa, de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN).

3.10 Oxidantes/Antioxidantes

Nos grupos de animais submetidos ao protocolo de avaliação da **Fase Aguda**, nós também estudamos os níveis de oxidantes/antioxidantes no parênquima pulmonar através de técnicas de imunohistoquímica. Para a avaliação imunohistoquímica, cortes dos pulmões foram desparafinizados e hidratados.

Etapa 1 - Recuperação antigênica: através de Proteinase K por 20 minutos (37°C), seguidos de descanso de 20 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, as lâminas foram lavadas em PBS.

Etapa 2 - Bloqueio e Incubação com Anticorpo Primário: bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada (H₂O₂) 10V 3% (3 x 10 minutos), seguidos de incubação com anticorpos primários: anti-cobre-zinco SOD (-CuZnSOD) (policlonal produzido em cabra, 1:2000; sc-8637; Santa Cruz), anti-manganês SOD (-MnSOD) (policlonal produzido em cabra, 1:200; sc-18503; Santa Cruz), anti-glutationa peroxidase (-Gpx) (policlonal produzido em cabra, 1:80; sc-22146; Santa Cruz), anti-gp91^{phox} (policlonal produzido em cabra, 1:500; sc-5827; Santa Cruz) e anti-óxido nítrico sintase induzida (-iNOS) (policlonal produzido em coelho, 1:1500; Santa Cruz), os quais foram aplicados sobre os cortes relativos ao experimento e também aos controles (positivo e negativo) de tecido, e as lâminas incubadas durante a noite (“overnight”).

Etapa 3 – Incubação com Anticorpo Secundário e Complexo: As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas pelo ABCKit Vectastain (Vector Elite- PK-6105 (anti-cabra) / PK-6101 (anti-coelho)).

Etapa 4 - Revelação: As lâminas foram lavadas em PBS e reveladas pelo cromógeno 3,3-Diaminobenzidine (DAB) (Sigma Chemical Co, Saint Louis, Missouri, EUA).

Etapa 5 - Contra-Coloração e Montagem das Lâminas: As lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) (Toledo et al, 2012).

Foram medidas as densidades de células coradas positivamente com CuZnSOD, MnSOD, Gpx, gp91^{phox} e iNOS no parênquima pulmonar através de métodos morfométricos já descritos acima para células PMN e mononucleares (Ramos et al., 2010; Anciães et al., 2011; Gonçalves et al., 2012; Vieira et al., 2012).

3.11 Análise Estatística

Para análise estatística utilizamos o software Sigma Stat 11 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se o método de análise de variância para dois fatores através dos testes de múltiplas comparações (método Holm-Sidak). Para comparar a performance dos animais no teste de capacidade física antes e após o protocolo de atividade física aeróbia, utilizamos o teste-t pareado. Já para comparações do número de CFU nos pulmões dos camundongos infectados, usamos teste t não pareado após transformação logarítmica dos dados. As diferenças foram consideradas como estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Teste de Capacidade Física

Após 4 semanas de treinamento físico aeróbio, os animais alcançaram uma velocidade maior no teste de capacidade física quando comparados aos valores obtidos antes de iniciar o protocolo de treinamento ($p<0,001$). Por outro lado, animais Controle (não submetidos ao protocolo de treinamento físico) apresentaram uma significativa diminuição da velocidade máxima atingida no teste de capacidade física inicial ($p<0,001$) (Figura 4).

Figura 4: Teste de Capacidade Física: Máxima velocidade alcançada na esteira ergométrica antes (teste inicial) e após 4 semanas de treinamento (teste final) (* $p<0,001$ comparado aos valores do teste inicial). Valores expressos em média e desvio padrão (SD).

Recuperação de Unidades Formadoras de Colônia (CFU)

Doze horas após os animais serem desafiados com a bactéria, o grupo *S. pneumoniae* apresentou maior quantidade de CFUs no homogenato de pulmão comparado aos animais do grupo Exercício + *S. pneumoniae* ($p=0,011$) (Figura 5). Vinte e quatro horas após o desafio, os animais do grupo *S. pneumoniae* continuaram a ter um número maior de CFUs no homogenato de pulmão quando comparados aos animais do grupo Exercício + *S. pneumoniae* ($p=0.043$) (Figura 6).

Figura 5: Recuperação de CFU dos pulmões: Medido em dois grupos experimentais: *S. pneumoniae* (n=8) e Exercício + *S. pneumoniae* (n=8), 12 horas após o desafio ($*p=0,011$). Valores expressos em média logarítmica e SD.

Figura 6: Recuperação de CFU dos pulmões: Medido em dois grupos experimentais: *S. pneumoniae* (n=8) e Exercício + *S. pneumoniae* (n=7), 24 horas após o desafio (*p=0,043). Valores expressos em média logaritimica e SD.

Avaliação da Mecânica Pulmonar

Fase Aguda: Animais do grupo *S. pneumoniae* apresentaram aumento na Resistência (Rrs) ($p < 0,05$) (Figura 7) e Elastância (Ers) (Figura 8) do Sistema Respiratório comparados com os outros três grupos. O treinamento físico resultou em atenuação dessas alterações na mecânica do sistema respiratório induzidas pelo *S. pneumoniae*. Não foram observadas diferenças entre os grupos Controle, Exercício e Exercício + *S. pneumoniae*.

Figura 7: Avaliação da Mecânica Pulmonar: Resistência do Sistema Respiratório (Rrs) medida nos 4 grupos experimentais 12 horas após a instilação de *S. pneumoniae*: (A) - Controle (n=7); Exercício (n=7); *S. pneumoniae* (n=8); Exercício + *S. pneumoniae* (n=8).(* $p < 0,05$ comparado aos outros 3 grupos). Valores expressos em média e SD.

Figura 8: Avaliação da Mecânica Pulmonar: Elastância do Sistema Respiratório (Ers) medida nos 4 grupos experimentais 12 horas após a instilação de *S. pneumoniae*: Controle (n=7); Exercício (n=7); *S. pneumoniae* (n=8); Exercício + *S. pneumoniae* (n=8).(*p<0,005 comparado aos outros 3 grupos). Valores expressos em média e SD.

Fase Tardia: Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os quatro grupos experimentais tanto na medida de Rrs (Figura 9) como de Ers (Figura 10).

Figura 9: Avaliação da Mecânica Pulmonar: Resistência do Sistema Respiratório (Rrs) medida nos 4 grupos experimentais 10 dias após a instilação de *S. pneumoniae*: Controle (n=7); Exercício (n=7); *S. pneumoniae* (n=8); Exercício + *S. pneumoniae* (n=8). Valores expressos em média e SD.

Figura 10: Avaliação da Mecânica Pulmonar: Elastância do Sistema Respiratório (Ers) medida nos 4 grupos experimentais 10 dias após a instilação de *S. pneumoniae*: Controle (n=7); Exercício (n=7); *S. pneumoniae* (n=8); Exercício + *S. pneumoniae* (n=8). Valores expressos em média e SD.

Avaliação do Lavado Broncoalveolar (BAL)

Fase Aguda: A instilação do *S. pneumoniae* induziu um aumento significativo no número total de células no BAL ($p<0,001$), assim como de neutrófilos ($p<0,001$), macrófagos ($p<0,001$) e linfócitos ($p<0,002$) no grupo *S. pneumoniae* quando comparado aos outros grupos. Animais que foram submetidos ao protocolo de atividade física e receberam instilação de bactéria (grupo Exercício + *S. pneumoniae*) apresentaram valores menores no número total de células ($p<0,001$), neutrófilos ($p<0,001$), macrófagos ($p<0,001$) e linfócitos ($p=0,002$) no BAL quando comparados ao grupo *S. pneumoniae*, embora o número total de células e de neutrófilos tenha permanecido maior que os dos grupos Controle (grupo Controle e Exercício, $p<0,001$) (Figura 11).

Figura 11: Células Inflamatórias no Lavado Broncoalveolar (BAL) 12 horas após a administração de *S. pneumoniae*: Número de células totais, macrófagos e neutrófilos (* $p<0,001$ comparado aos outros 3 grupos; ** $p<0,001$ comparado aos grupos Controle e Exercício); e linfócitos (* $p<0,002$ comparado aos outros 3 grupos). Valores expressos em média e SD.

Fase Tardia: Dez dias após a instilação de *S. pneumoniae* (grupos *S. pneumoniae* e Exercício + *S. pneumoniae*) ainda havia um aumento no número total de células ($p<0,001$), macrófagos ($p<0,001$), neutrófilos ($p<0,001$) e linfócitos ($p=0,006$) no BAL comparado aos grupos Controles (grupos Controle e Exercício). Além disso, houve uma atenuação no aumento do número total de células e de macrófagos nos camundongos submetidos ao protocolo de treinamento físico ($p<0,001$ comparando grupo *S. pneumoniae* ao grupo Exercício + *S. pneumoniae*) (Figura 12).

Figura 12: Células Inflamatórias no Lavado Broncoalveolar (BAL) 10 dias após a administração de *S. pneumoniae*: Número total de células e macrófagos (* $p<0,001$ comparado aos outros 3 grupos e ** $p<0,001$ comparado aos grupos Controle e Exercício); neutrófilos (^φ $p<0,001$ comparado aos grupos Controle e Exercício) e linfócitos (^φ $p=0,006$ comparado aos grupos Controle e Exercício). Valores expressos em média e SD.

Avaliação de Células Polimorfonucleares (PMN)

Fase Aguda: No parênquima pulmonar dos animais que receberam a instilação de bactéria (grupos *S. pneumoniae* e Exercício + *S. pneumoniae*) observou-se aumento no número de células PMN comparado aos animais que não a receberam (grupo Controle e Exercício) ($p < 0,001$). No entanto, o grupo Exercício + *S. pneumoniae* apresentou menos células PMN no parênquima pulmonar quando comparado ao grupo *S. pneumoniae* ($p = 0,017$) (Figura 13).

Figura 13: Células polimorfonucleares no parênquima pulmonar 12 horas após a administração de *S. pneumoniae* (* $p < 0,001$ comparado aos grupos Controle e Exercício e $p = 0,017$ comparado ao grupo Exercício + *S. pneumoniae*; ** $p < 0,002$ comparado aos grupos Controle e Exercício). Valores expressos em média e SD.

Fase Tardia: O parênquima pulmonar dos animais do grupo *S. pneumoniae* apresentou aumento no número de células PMN quando comparado aos outros três grupos ($p<0,025$) (Figura 14).

Figura 14: Células polimorfonucleares no parênquima pulmonar 10 dias após a administração de *S.pneumoniae* (* $p<0,025$ comparado aos outros 3 grupos). Valores expressos em média e SD.

Avaliação das Citocinas no Homogenato de Pulmão

Fase Aguda: Grupo *S. pneumoniae* apresentou aumento na expressão de KC (* $p < 0,001$) (Figura 15) e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α ($p < 0,001$) e IL-1 β ($p = 0,03$) (Figura 16) no homogenato pulmonar comparado aos outros três grupos. O treinamento físico resultou na atenuação do aumento dessas citocinas induzido pelo *S. pneumoniae*. De fato, não observamos diferenças significantes entre os grupos Controle, Exercício e Exercício + *S. pneumoniae*. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IL-6 (Figura 17).

Figura 15: Quimiocina KC no homogenato pulmonar 12 horas após a administração de *S. pneumoniae*: KC (* $p < 0,001$ comparado aos outros 3 grupos). Valores expressos em média e SD.

Figura 16: Citocinas no homogenato pulmonar 12 horas após a administração de *S. pneumoniae*: TNF- α (* $p < 0,001$ comparado aos outros 3 grupos) e IL-1 β (* $p = 0,012$ comparado aos grupos Controle e Exercício e $p = 0,03$ comparado ao grupo Exercício + *S. pneumoniae*) Valores expressos em média e SD.

Figura 17: Citocinas no homogenato pulmonar 12 horas após a administração de *S. pneumoniae*: IL-6. Valores expressos em média e SD.

Fase tardia: Os animais do grupo *S. pneumoniae* permaneceram com aumento significativo de KC (* $p<0,03$) (Figura 18) quando comparados aos demais grupos (não houve diferença entre o grupo Controle, Exercício e Exercício + *S. pneumoniae*). Não foi encontrada diferença significativa entre os níveis de TNF- α (Figura 19) entre os quatro grupos experimentais. Os animais que receberam instilação da bactéria (grupo *S. pneumoniae* e Exercício + *S. pneumoniae*) apresentaram aumento da expressão de IL-1 β (Figura 19) quando comparados aos animais que não receberam o desafio (grupos Controle e Exercício, $p=0,002$). Animais do grupo *S. pneumoniae* mostraram aumento na expressão de IL-6 ($p=0,005$), quando comparados aos outros três grupos. A atividade física foi efetiva em reduzir esta citocina em animais que receberam a bactéria ($p<0,001$).

Figura 18: Quimiocina no homogenato pulmonar 10 dias após a administração de *S. pneumoniae*: KC (* $p<0,03$ comparado aos outros 3 grupos). Valores expressos em média e SD.

Figura 19: Citocinas no homogenato pulmonar 10 dias após a administração de *S. pneumoniae*: TNF- α e IL-1 β (* $p=0,002$ comparado aos grupos Controle e Exercício). Valores expressos em média e SD.

Figura 20: Citocinas no homogenato pulmonar 10 dias após a administração de *S. pneumoniae*: IL-6 (* $p=0,005$ comparado aos grupos Controle e Exercício e * $p<0,001$ comparado ao grupo Exercício + *S. pneumoniae*). Valores expressos em média e SD.

Avaliação do Estresse Oxidativo no Parênquima Pulmonar

Animais dos grupos submetidos ao treinamento físico (Exercício e Exercício + *S. pneumoniae*) apresentaram aumento na expressão de CuZnSOD ($p<0,001$) e MnSOD ($p=0,005$) (Figura 21) comparados com os grupos que permaneceram sedentários (grupos Controle e *S. pneumoniae*), 12 horas após o desafio (Fase Aguda). Também foi observado aumento na expressão de CuZnSOD no grupo *S. pneumoniae* comparado ao grupo Controle ($p<0,001$). Nos grupos que receberam desafio de *S. pneumoniae* (grupos *S. pneumoniae* e Exercício + *S. pneumoniae*) observamos aumento na expressão de Gpx ($p<0,05$) e gp91^{phox} ($p<0,01$) (Figura 22) quando comparado aos grupos que não receberam instilação (grupos Controle e Exercício). Na avaliação da iNOS (Figura 23), os grupos que receberam desafio com bactéria apresentaram aumento na expressão desta enzima quando comparada com os outros dois grupos ($p<0,001$). Além disso, o grupo Exercício + *S. pneumoniae* apresentou valores superiores de iNOS comparado ao grupo *S. pneumoniae* ($p<0,007$).

Figura 21: Expressão do estresse oxidativo no parênquima pulmonar 12 horas após a administração de *S. pneumoniae*: CuZnSOD (* $p < 0,001$ comparado aos grupos Controle e *S. pneumoniae* e ** $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle) e MnSOD (* $p = 0,005$ comparado aos grupos Controle e *S. pneumoniae*). Valores expressos em média e SD.

Figura 22: Expressão do estresse oxidativo no parênquima pulmonar 12 horas após a administração de *S. pneumoniae*: Gpx (*p<0,05 comparado ao grupo Controle e Exercício) e gp91^{phox} (*p<0,01 comparado ao grupo Controle e Exercício). Valores expressos em média e SD.

Figura 23: Expressão de iNOS no parênquima pulmonar 12 horas após a administração de *S. pneumoniae*: (*p<0,007 comparado aos outros 3 grupos e **p<0,001 comparado ao grupo Controle). Valores expressos em média e SD.

5 DISCUSSÃO

Os principais resultados deste estudo sugerem que o treinamento físico aeróbio foi eficaz em atenuar tanto o processo infeccioso quanto o inflamatório pulmonar induzidos pela instilação intranasal de *S. pneumoniae* em camundongos. Na fase aguda da infecção, os animais que foram submetidos ao treinamento físico e que receberam o desafio com *S. pneumoniae* apresentaram menor quantidade de unidades formadoras de colônia (CFU), quando comparados àqueles que permaneceram sedentários e que foram desafiados. Além disso, os animais sedentários e posteriormente infectados apresentaram aumento da expressão de KC, que é um quimioatraente de neutrófilos, além do aumento no número de células do lavado broncoalveolar (BAL), decorrente principalmente do aumento de neutrófilos, assim como aumento das células polimorfonucleares (PMN) no tecido pulmonar e expressão de citocinas pró-inflamatórias no pulmão. Todo esse processo inflamatório determinou mudanças nos parâmetros de mecânica respiratória, como aumento da resistência e elastância do sistema respiratório. Nessa fase, a atividade física aeróbia foi responsável por atenuar todos esses parâmetros, que indicam a presença do processo inflamatório induzido pelo *S. pneumoniae*.

Em uma fase mais tardia, embora o processo inflamatório seja menos intenso, os animais infectados ainda apresentaram aumento da expressão de KC, assim como de células no BAL, agora principalmente devido ao aumento do número de macrófagos. O número de células PMN, assim como a expressão de algumas citocinas, também se manteve elevado, não havendo mais diferença nos parâmetros de mecânica respiratória. Da mesma forma que na fase aguda da infecção, os animais que foram submetidos à atividade física aeróbia prévia mantiveram os parâmetros inflamatórios atenuados.

Muitos grupos de pesquisa têm desenvolvido modelos experimentais de pneumonia pneumocócica com as mais variadas finalidades, mas com o

objetivo principal de estudar os mecanismos fisiopatológicos e tratamento para um processo patológico que ainda se mantém como um dos principais causadores de pneumonia em seres humanos (Stegenga et al., 2009; Lima et al., 2012; Innqjerdigen et al., 2013). Em modelos animais, foi observado que a pneumonia é dependente tanto da linhagem da bactéria, quanto da suscetibilidade dos animais (Mohler et al., 2003; Ferreira et al., 2009). Assim, para a realização deste trabalho não só nos baseamos em um estudo de Ferreira et al. (2009) como realizamos colaboração com esse mesmo grupo. Ferreira et al. (2009) submeteram camundongos BALB/c a duas diferentes linhagens de pneumococo. Em ambas, os animais apresentaram sinais da doença após 12 horas da inoculação. No entanto, enquanto o sorotipo 3, linhagem ATCC6303 causou a morte dos animais em 5 dias, após o sorotipo 11A, linhagem M10, os animais conseguiram se recuperar da infecção e, em 36 horas, já não foram encontrados vestígios da bactéria no homogenato de pulmões. Além disso, os animais inoculados com M10 apresentaram aumento do número de células e citocinas após 12 horas do desafio. Para o nosso estudo, utilizamos o sorotipo 11A linhagem M10, pois o nosso objetivo foi verificar se o exercício físico aeróbio atenuava o processo inflamatório pulmonar induzido pelo *S. pneumoniae*, utilizando um modelo experimental que não levasse à morte dos animais.

Assim, os nossos resultados estão em concordância com esse estudo no qual nos baseamos, uma vez que, ao utilizarmos essa linhagem de bactéria, encontramos aumento do número de CFUs no pulmão dos animais desafiados, além do aumento no número de células inflamatórias no BAL (principalmente devido ao número de neutrófilos) e no parênquima pulmonar, assim como aumento de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β após 12 horas da inoculação.

Embora, não se tenha encontrado a presença de pneumococos após 36 horas da inoculação, decidimos avaliar os animais após 10 dias do desafio. Nesse momento, o processo inflamatório ainda está ativo, porém atenuado, ou seja, ainda encontramos aumento de células inflamatórias no BAL, embora o perfil celular tenha mudado e, agora, o principal responsável seja o macrófago, embora no parênquima pulmonar as células PMN ainda estejam aumentadas

nos animais que receberam o desafio. O perfil de citocinas pró-inflamatórias também mudou, uma vez que já não encontramos diferenças na expressão de TNF- α embora IL-1 β permaneça aumentada e apareça aumento na expressão de IL-6.

Na primeira linha de defesa do hospedeiro durante as infecções respiratórias bacterianas estão os macrófagos, que têm um papel fundamental na resposta inata, fagocitando as bactérias e coordenando a resposta inata à infecção. No entanto, quando o inóculo é muito grande ou muito virulento, os macrófagos se tornam incapazes de conter a infecção, orquestram uma rede complexa de citocinas e de recrutamento de células PMN, que ajuda a conter este processo fisiopatológico. Esse recrutamento providencia um aumento da capacidade fagocítica, que é essencial na erradicação do patógeno (Sibille & Reynolds, 1990). Uma dessas substâncias derivadas do macrófago alveolar é a KC, uma quimiocina homóloga à IL-8, que é um potente quimioatraente de neutrófilos (Sibille & Reynolds, 1990; Standiford et al., 1996).

Alguns estudos em modelos animais já demonstraram que o desafio intrapulmonar, tanto com bactérias como com LPS, leva a um rápido recrutamento de células PMN para os pulmões, podendo representar de 60 a 80% das células recuperadas do BAL, de 3 a 4 horas do desafio (Nelson et al., 1989; Zhang et al., 1999). Zhang et al. (1999) observaram um rápido aumento de células PMN no espaço alveolar após 4 horas da instilação intratraqueal de LPS. Além disso, estudos encontraram que após a instilação com LPS, os animais desenvolvem uma alveolite neutrofílica no trato respiratório inferior, enquanto que sem o desafio, as células predominantes no BAL eram os macrófagos alveolares. Da mesma forma, em animais desafiados, a expressão de TNF- α cresceu rapidamente, sugerindo que esta citocina, produzida por macrófagos alveolares, ajuda a orquestrar o recrutamento de células PMN que são essenciais na eliminação do patógeno (Nelson et al., 1991; Kolls et al., 1995). Já Araujo et al. (2012) submeteram camundongos à sepse e encontraram aumento do número de células no BAL, assim como de neutrófilos. Além disso, demonstraram que os animais submetidos à atividade física apresentaram diminuição nestes parâmetros.

Bergeron et al. (1998), em seu modelo temporal de infecção experimental por *S. pneumoniae*, encontraram aumento de PMN no sangue, tecido pulmonar e BAL, 2 a 4 horas após o desafio, atingindo seu máximo em 24 horas. Fillion et al. (2001) também observaram, em seu modelo experimental de infecção pulmonar por *S. pneumoniae*, que os neutrófilos começaram a aumentar seu número nos alvéolos 4 horas após a inoculação, com aumento adicional em 12 horas, mantendo os níveis aumentados até 48 horas, quando o número dessas células começou a cair. Já os macrófagos alveolares residentes estavam presentes antes da infecção, no entanto, seu recrutamento começou a se tornar evidente após 48 horas. Já Amano et al. (2004), que desafiaram os animais com *P. aeruginosa*, também demonstraram uma cinética inflamatória celular semelhante à observada em nosso estudo, onde no primeiro momento os neutrófilos aparecem em maior número, para depois haver um aumento no número de macrófagos no BAL.

Da mesma forma que os neutrófilos parecem ser cruciais na defesa do hospedeiro, eles se tornam apoptóticos rapidamente após matarem as bactérias, liberando enzimas que podem causar danos aos tecidos (Haslett, 1999). Exemplo disso é o fato de que o aumento persistente dessas células é encontrado em casos fatais de infecções pulmonares ou sepse (Johnston, 1991). Com isso, em uma fase de resolução da infecção, os macrófagos, principais fagocitadores dos neutrófilos apoptóticos, tornam-se essenciais, (Haslett, 1999) para evitar maiores injúrias aos tecidos, o que explicaria o seu aumento em uma fase mais tardia da infecção.

Além disso, o perfil das citocinas que obtivemos em nosso estudo também parece estar de acordo com o que encontramos na literatura, uma vez que, na fase inicial, as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β aparecem aumentadas em animais que sofreram o desafio infeccioso e a IL-6, em uma fase mais tardia nesses mesmos animais. A citocina TNF- α é uma citocina considerada de alarme, por causa da sua rápida produção após um estímulo, específico ou não, ativando tanto macrófagos como células PMN, aumentando, conseqüentemente, a fagocitose e os processos oxidativos. Já a IL-1 β , que também é uma citocina pró-inflamatória, embora seja considerada mais de fase inicial, parece ser a responsável pelo aumento sustentado de macrófagos em

uma fase mais tardia. Assim como os neutrófilos, embora elas sejam essenciais na sinalização e eliminação do patógeno na fase aguda, a produção excessiva de ambas aparece em modelos de sepse. A neutralização de ambas parece conferir proteção contra a morte. Bergeron et al. (1998), em estudo da cinética da infecção pulmonar por *S. pneumoniae*, observaram que o TNF- α foi a primeira citocina a aparecer aumentada no tecido pulmonar e junto com IL-1 β , atingiu seu pico em 12 horas no BAL. Chen et al. (2007), em estudo com ratos submetidos à endotoxemia por infusão (i.v.) de LPS, também encontraram um aumento tanto de TNF- α como de IL-1 β no plasma.

Além disso, sob a influência de ambas citocinas (TNF- α e IL-1 β), a IL-6 é produzida e pode ser encontrada em altas concentrações nos pulmões de pacientes durante a pneumonia (Boutten et al., 1996; Schultz & Van der Poll, 2002). É uma citocina pró-inflamatória produzida por muitos tipos celulares, embora sua fonte primária seja os macrófagos e monócitos, já demonstrou ter um importante papel na defesa do hospedeiro contra infecções, embora ainda não se saiba especificamente qual (Murphy et al., 2008). Em um estudo com animais deficientes em IL-6, Van der Poll et al. (1997) demonstraram que esses animais foram incapazes de controlar efetivamente a infecção por *S. pneumoniae*. Já Murphy et al. (2008) também encontraram uma maior suscetibilidade à infecção pelo vírus da herpes em animais *knockout* para IL-6. Além disso, Antunes et al. (2002) estudaram a cinética do TNF- α e IL-6, entre outras citocinas, em pacientes admitidos no hospital por pneumonia adquirida na comunidade. Encontraram que, logo na admissão, os pacientes apresentaram uma alta concentração dessas citocinas no sangue, que diminuiu progressivamente durante 5 dias, naqueles pacientes que sobreviveram. Starkie et al. (2003) desafiaram com LPS homens jovens em repouso, ou que se exercitaram exaustivamente ou que recebiam IL-6. Após o desafio, tanto o grupo exercício como o grupo que recebia IL-6 tiveram uma diminuição da expressão de TNF- α no plasma, quando comparados com o grupo que permaneceu em repouso, sugerindo que o exercício induziu a produção de IL-6 pelo músculo, agindo como uma citocina anti-inflamatória, bloqueando a produção de TNF- α .

Além disso, todo esse processo inflamatório gerado pelo desafio com *S. pneumoniae* levou, no nosso estudo, a alterações em parâmetros da mecânica respiratória, como aumento da Resistência e Elastância do sistema respiratório na fase mais aguda do processo infeccioso. Nessa fase, a atividade física atenuou esse processo, tanto no BAL como no tecido daqueles animais que receberam o desafio. Na fase tardia, com o processo inflamatório já atenuado, a diferença entre os grupos deixou de existir. Tais resultados estão respaldados por diferentes modelos experimentais que desenvolvemos em nosso grupo, em que são gerados intensos processos inflamatórios no pulmão (Ramos et al., 2010; Anciães et al., 2011; Toledo et al., 2012). Araujo et al. (2012) também demonstraram que nos animais em que a sepse foi induzida apresentaram aumento de elastância e resistividade, assim como na viscoelasticidade. E que a atividade física prévia atenuou todos esses parâmetros.

Existem muitas evidências epidemiológicas de que o exercício moderado pode reduzir o risco e a gravidade das infecções, enquanto o exercício exaustivo pode aumentar o risco e gravidade dessas infecções, embora a maioria desses estudos esteja relacionada ao risco de infecção viral (Nieman et al., 1990; Matthews et al., 2002). Esses efeitos de diferentes intensidades do exercício também foram vistos em modelos animais de infecção, onde o exercício moderado tende a diminuir a morbidade e a mortalidade, embora o aumento da sua duração e intensidade aumente essa mortalidade (Davis et al., 1997; Lowder et al., 2005; Murphy et al., 2008)

Nos últimos anos, a atividade física tem se tornado objeto de estudo em vários modelos experimentais e clínicos do nosso grupo de pesquisa. Demonstramos nesses estudos que a atividade física regular parece ter um efeito protetor contra várias doenças inflamatórias pulmonares. Vieira et al. (2007) (2011), Silva RP et al. (2010) (2014), Silva AC et al. (2012) e Olivo et al. (2012), demonstraram que a atividade física atenuou o processo inflamatório em modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica, tanto em camundongos como em cobaias. Corroborando estes dados, Mendes et al. (2010) (2011) (2013) ressaltaram os efeitos positivos do exercício quando realizados por pacientes asmáticos. Toledo et al. (2012), observaram que a

atividade física teve um papel atenuador das alterações pulmonares induzidas pela exposição de camundongos à fumaça de cigarro, assim como Vieira et al. (2012) quando expuseram os animais a poluentes atmosféricos.

Além disso, outros grupos de pesquisa têm investido em estudos que demonstrem o efeito positivo da atividade física em infecções pulmonares. Lowder et al. (2005) submeteram camundongos à atividade física após terem recebido instilação intranasal do vírus *influenza*. Observaram que a atividade física moderada diminuiu a mortalidade, enquanto que a atividade física intensa aumentou a morbidade e tendeu a diminuir a sobrevida dos animais, embora não fosse diferente dos animais que não realizaram atividade física. Já Kohut et al. (2009) demonstraram que animais submetidos a um protocolo crônico de atividade física e ao desafio intrapulmonar com vírus *influenza*, apresentavam diminuição das citocinas inflamatórias, redução de sintomas e carga viral, entre outros benefícios. Liebetanz et al. (2012) também demonstraram que a atividade física, realizada antes da infecção, aumenta a sobrevida em camundongos com meningite bacteriana induzida pelo *S. pneumoniae*. Chen et al. (2007) observaram atenuação no aumento, tanto de TNF- α como de IL-1 β gerados pela infusão de LPS em ratos submetidos à atividade física. Em estudo realizado por Sossdorf et al. (2013), a atividade física foi capaz de reduzir a circulação de IL-6 em seu modelo experimental de sepse polimicrobiana. Além disso, Nunes et al. (2013) submeteram ratos com insuficiência cardíaca crônica à atividade física aeróbia e também encontraram nesses animais atenuação das citocinas TNF- α e IL-6 no plasma.

Embora já se saiba que a atividade física aeróbia regular possa ter um efeito anti-inflamatório, no nosso conhecimento, nenhum estudo experimental prévio elucidou os principais mecanismos que fazem a atividade física regular resultar em efeitos anti-inflamatórios contra a infecção bacteriana pulmonar por *S. pneumoniae*. Existem algumas hipóteses para esse efeito positivo da atividade física, como a redução da massa gorda visceral, que leva à diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias do tecido adiposo; melhora da condição cardiovascular, diminuição das concentrações de triglicérides e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e aumento da concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL); aumento na circulação

de hormônios como cortisol e catecolaminas, que possuem efeito anti-inflamatório; aumento na produção e liberação de citocinas anti-inflamatórias pela contração muscular e redução na expressão de receptores *toll-like* nos monócitos e macrófagos. Algumas dessas mudanças podem induzir um ambiente anti-inflamatório na pessoa fisicamente ativa, com muitos benefícios para a saúde como menor suscetibilidade a doenças inflamatórias e suas consequências. No entanto, os mecanismos moleculares responsáveis pela interação entre atividade física e a atenuação na infecção bacteriana pulmonar precisam ser mais detalhadamente elucidados (Gleeson et al., 2011).

Um mecanismo que tem sido sugerido como responsável pelos efeitos positivos da atividade física regular é a balança favorável da produção de enzimas oxidantes e antioxidantes. Cada sessão de exercício resulta em um ambiente pró-oxidante que, por conseguinte, induz uma resposta antioxidante. Assim, na atividade física regular, a capacidade do nosso corpo em produzir enzimas antioxidantes está aumentada (Radak et al., 2008). Em contraste, o principal mecanismo antimicrobiano de defesa do hospedeiro é a eliminação dos microrganismos através da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) liberadas pelos neutrófilos. No entanto, um excessivo recrutamento de neutrófilos produzindo ROS pode ser perigoso, uma vez que o principal achado em casos fatais de pneumonia pneumocócica é o infiltrado neutrofílico persistente nos pulmões (Johnston, 1991).

Observamos um aumento na expressão de CuZnSOD e MnSOD, duas isoformas da superóxido dismutase, que agem nos radicais superóxido com a finalidade de formar oxigênio e espécies menos reativas, nos pulmões de camundongos que foram submetidos ao treinamento físico, sugerindo um efeito antioxidante do exercício. Nakao et al. (2000), embora tenham encontrado uma redução de CuZnSOD nos pulmões de camundongos submetidos a um protocolo de natação, encontraram aumento da expressão de MnSOD. Lawler et al. (2009) também encontraram um aumento da expressão dessa enzima no coração de ratos, tanto jovens como idosos, submetidos a um protocolo de atividade física de 12 semanas, embora a expressão de CuZnSOD também não tenha mudado. Lima et al. (2013) encontraram aumento da expressão de MnSOD no fígado de ratos submetidos a um protocolo de natação.

Por outro lado, em nosso modelo, o desafio com *S. pneumoniae* induziu aumento da expressão de Gpx (glutathiona peroxidase) e gp91^{phox}. A Glutathiona-peroxidase é outra enzima antioxidante, que ajuda a remover o peróxido de hidrogênio e hiperóxidos das células, servindo como importante protetor contra danos dos radicais livres. O gp91^{phox} faz parte do complexo NADPH na membrana das células e é capaz de produzir ânions superóxido com a finalidade, por exemplo, de matar bactérias. Marriot et al. (2008) usaram camundongos *knockout* para gp91^{phox} (gp91^{phox-/-}) e infectados com pneumococo, e observaram uma diminuição na inflamação, mas não na morte microbiana, sugerindo que o complexo NADPH oxidase age mais na resposta inflamatória do que na eliminação do patógeno. Além disso, Gonçalves et al. (2012) encontraram aumento na expressão de MnSOD em camundongos submetidos a um protocolo de baixa intensidade de atividade física e aumento da expressão de Gpx em animais que foram desafiados com LPS.

Além disso, os nossos animais que receberam a instilação com pneumococo também apresentaram um aumento na expressão de iNOS. No entanto, naqueles submetidos à atividade física e ao desafio, esse aumento foi ainda maior. O NO (óxido nítrico) e as espécies reativas de nitrogênio, são essenciais em várias funções fisiológicas, incluindo a eliminação de microrganismos invasores (Ricciardolo et al., 2006). Mariott et al. (2006) demonstraram uma diminuição na porcentagem de apoptose dos macrófagos nos pulmões de camundongos iNOS^{-/-} infectados com pneumococo, associada a um aumento dos marcadores inflamatórios nos pulmões. Além disso, Breitbach et al. (2011), em estudo experimental com BALB/c, encontraram que in vitro a atividade de eliminação de patógenos pelos macrófagos primários está diminuída quando o NO foi inibido, sugerindo que o NO contribui para a resistência na suscetibilidade inata desses animais. Da mesma forma, Saini et al. (2011) sugeriram, em modelo experimental de infecção pulmonar por *S. pneumoniae*, que a produção de NO durante os primeiros estágios da infecção pode contribuir para a eliminação dessa bactéria.

Considerando estes estudos prévios, podemos sugerir que no nosso modelo um dos possíveis mecanismos de atenuação do processo inflamatório causado pelo *S. pneumoniae* deva-se ao aumento da expressão de iNOS

induzido pelo exercício, em adição ao aumento de enzimas antioxidantes, como CuZnSOD e MnSOD, induzidas também pelo exercício.

Assim podemos sugerir que a atividade física regular tem um papel regulador no processo inflamatório, consequente à infecção bacteriana por *S. pneumoniae*, por uma provável alteração favorável na balança oxidante-antioxidante.

6 CONCLUSÃO

Ao final, podemos concluir que o exercício aeróbio atenua a inflamação pulmonar induzida pelo *Streptococcus pneumoniae* em camundongos BALB/c.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*.2006;124(4):783-801.

Amano H, Morimoto K, Senba M, Wang H, Ishida Y, Kumatori A, Yoshimine H, Oishi K, Mukaida N, Nagatake T. Essential contribution of monocyte chemoattractant protein-1/C-C chemokine ligand-2 to resolution and repair processes in acute bacterial pneumonia. *J Immunol*. 2004;172(1):398-409.

Anciães AM, Olivo CR, Prado CM, Kagohara KH, Pinto TS, Moriya HT, Mauad T, Matins MA, Lopes FDTQS. Respiratory mechanics do not always mirror pulmonary histological changes in emphysema. *Clinics*. 2011;66:1797-1803.

Andaluz-Ojeda D, Bobillo F, Iglesias V, Almansa R, Rico L, Gandia F, resino S, Tamayo E, de Lejarazy RO, Bermejo-Martin JF. A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. *Cytokine*. 2012;57(3):332-6.

Antunes G, Evans SA, Lordan JL, Frew AJ. Systemic cytokine levels in community-acquired pneumonia and their association with disease severity. *Eur Respir J.* 2002;20(4):990-5.

Araujo CC, Silva JD, Samary CS, Guimarães IH, Marques PS, Oliveira GP, Carmo LGRR, Goldenberg RC, Bakker-Abreu I, Diaz BL, Rocha NN, Capelozzi VL, Pelosi P, Rocco PRM. Regular and moderate exercise before experimental sepsis reduces the risk of lung and distal organ injury. *J Appl Physiol.* 2012;112(7):1206-4.

Armstrong GL, Conn LA, Pinner RW. Trend in infectious disease mortality in the United States during the 20th century. *JAMA.* 1999;281(1):61-6.

Amstrong RB, Ogilvie RW, Schwane JA. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1983;54(1):80-93.

Avula CP, Fernandes G. Modulation of antioxidant enzymes and apoptosis in mice by dietary lipids and treadmill exercise. *J Clin Immunol.* 1999;19(1),35–44.

Avula CP, Muthukumar AR, Zaman K, McCarter R, Fernandes G. Inhibitory effects of voluntary wheel exercise on apoptosis in splenic lymphocyte subsets of C57BL/6 mice. *J Appl Physiol.* 2001;91(6),2546–52.

Bartlett JG, Dowell SF, Mandell LA, File Jr TM, Musher DM, Fine MJ. Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2000;31(2):347-82.

Barton BE. IL-6: insights into novel biological activities. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997;85(1):16-20.

Bergeron Y, Ouellet N, Deslauriers AM, Simard M, Olivier M, Bergeron MG. Cytokines kinetic and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect Immun.* 1998;66(3):912-22.

Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett Jr CC. Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis via a mechanism involving platelet-activating factor. *J Trauma.* 1996;40(4):575-8.

Boutten A, Dehoux MS, Seta N, Ostinelli J, Venembre P, Crestani B, Dombret MC, Durand G, Aubier M. Compartmentalized IL-8 and elastase release within the human in unilateral pneumonia. *Am J Crit Care Med.* 1996;153(1):336-42.

Branger J, Knapp S, Weijer S, Leemans JC, Pater JM, Speelmann P, Florquin S, Van der Poll T. Role of Toll-like receptor in gram-positive and gram-negative pneumonia in mice. *Infect Immun.* 2004;72(2):788-94.

Breitbach K, Wongprompitak P, Steinmetzl I. Distinct roles for nitric oxide in resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice to control *Burkholderia pseudomallei* infection. *BMC Immunol.* 2011;16:12:20.

Campos JC, Gomes KMS, Ferreira JCB. Impacto of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases. *Food Chem Toxicol.* 2013;62:107-19.

Cannon JG, Kluger MJ. Exercise enhances survival rate in mice infected with *Salmonella typhimurium*. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1984;175(4):518-21.

Chiavolini D, Pozzi G, Ricci S. Animal Models of *Streptococcus pneumoniae* Disease. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(4):666-85.

Chen HI, Hsieh SY, Yang FL, Hsu YH, Lin CC. Exercise training attenuates septic responses in conscious rats. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;39(3):435-42.

Datasus – Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Ministério da Saúde – Brasil. Disponível: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/niuf.def>; Acesso: 03.Jan.2015.

Davis JM, Kohut ML, Colbert LH, Jackson DA, Ghaffar A, Mayer EP. Exercise, alveolar macrophage function and susceptibility to respiratory infection. *J Appl Physiol.* 1997;83(5):1461-6.

Davis JM, Murphy EA, Brown AS, Carmichael MD, Ghaffar A, Mayer EP. Effects of oat β -glucan on innate immunity and infection after exercise stress. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36(8):1321-7.

Dehoux MS, Boutten A, Ostinelli, Sta N, Dombret MC, Crestani B, Deschenes M, Trouillet JL, Aubier M. Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150(3):710-6.

Dinarelli CA. Biologic Basis of interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996;87(6):2095-147.

DiPenta JM, Johson JG, Murphy RJ. Natural killer cells and exercise training in the elderly: a review. *Can J Appl Physiol.* 2004;29(4):419-43.

Dockrell DH, Marriott HM, Prince LR, Ridger VC, Ince PG, Hellewell PG, Whyte MKB. Alveolar macrophage apoptosis contributes to pneumococcal clearance in a resolving model of pulmonary infection. *J Immunol.* 2003; 171(10):5380-8.

Dockrell DH, Whyte MKB, Mitchell TJ. Pneumococcal Pneumonia: Mechanisms of Infection and Resolution. *Chest.* 2012;142(2):482-91.

Ferreira DM, Moreno AT, Cianciarullo AM, Ho PL, Oliveira MLS, Miyaji EN. Comparison of the pulmonary response against lethal and non-lethal intranasal challenges with two different pneumococcal strains. *Microbial Pathogenesis.* 2009;47(3):157-63.

File TM Jr, Marrie TJ. Burden of community-acquired pneumonia in North American adults. *Postgrad Med.* 2010;122(2):130-41.

Fillion I, Ouellet N, Simard M, Bergeron Y, Sato Sachiko, Bergeron MG. Role of chemokines and formyl peptides in pneumococcal pneumonia-induced monocyte/macrophage recruitment. *J Immunol.* 2001;166(12):7353-61.

Flynn MG, McFarlin BK. Toll-like receptor 4: link to the anti-inflammatory effects of exercise? *Exerc Sport Sci Rev.* 2006;34(4):176-81.

Freitas M, Gomes A, Porto G, Fernandes E. Nickel induces oxidative burst, NF- κ B activation and interleukin-8 production in human neutrophils. *Journal of Biological Inorganic Chemistry.* 2010;15(8):1275–83.

Gleeson M. Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol.* 2007 103(2):693-9.

Gleeson M, Bishop N, Oliveira M, Tauler P. Influence of training load on upper respiratory tract infection incidence and antigen-stimulated cytokine production. *Scand J Med Sci Sports.* 2013;23(4):451-7.

Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo M. A. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(9):607-15.

Gleeson M, McFarlin B, Flynn M. Exercise and toll-like receptors. *Exerc Immunol Rev.* 2006;12:34-53.

Gomes EC, Silva AN, de Oliveira MR. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:756132.

Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(2):126–31.

Gonçales CTR, Gonçalves CGR, Almeida FM, Lopes FDTQS, Durão ANCS, Santos FA, Silva LFF, Marcourakis T, Castro-Faria-Neto HC, Vieira RP, Dolhnikoff M. Protective effects of aerobic exercise on acute lung injury induced by LPS in mice. *Crit Care.* 2012;16(5):R199.

Gündüz F, Senturk UK, Kuru O, Aktekin B, Aktekin MR. The effect of one year's swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats. *Physiol Res.* 2004;53(2),171–6.

Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:136-47.

Hack CE, de Groot ER, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Strack Van Schijndel RJ, Eerenberg-Belmer AJ, Thijs LG, Aarden LA. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood.* 1989;74(5);1704-10.

Haslett C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:S5-S11.

Hathaway LJ, Brugger SD, Morand B.,Bangert M, Rotzetter JU, Hauser C, Graber WA, Gore S, Kadioglu A, Mühlemann K. Capsule type of *Streptococcus pneumoniae* determines growth phenotype. *PLoS Pathog.* 2012; 8(3):e1002574.

Hoffman-Goetz L, Pervaiz N, Guan J. Voluntary exercise training in mice increases the expression of antioxidant enzymes and decreases the expression of TNF- α in intestinal lymphocytes. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2009;23(4):498–506.

Horino T, matsumoto T, Uramatsu M, Tanabe M, Tateda K, Miyazaki S, Nakane A, Iwakura Y, Yamaguchi K. Interleukin-1 deficient mice exhibit high sensitivity to gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Cytokine.* 2005;30(6):339-46.

Ilback NG, Crawford DJ, Neufeld HA, Friman G. Does exercise stress alter susceptibility to bacterial infection? *Upsala J Med Sci.* 1991;96(1):63-8.

Innqjerdings KT, Langerud BK, Rasmussen H, Olsen TK, Austarheim I, Gronhaug TE, Aaberge IS, Diallo D, Paulsen BS, Michaellesen TE. Pectic polysaccharides isolated from Malian medicinal plants protect against *Streptococcus pneumoniae* in mouse pneumococcal infection model. *Scand J Immunol.* 2013;77(5):372-88.

Jankord R, Jemiolo B. Influence of physical activity on serum IL-6 and IL-10 levels in healthy older men. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36(6):960-4.

Johnston RB Jr. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Rev Infect Dis.* 1991;13(Suppl6):S509-17.

Jones MR, Simms BT, Lupa MM, Kogan MS, Mizgerd JP. Lung Nf-kB activation and neutrophil recruitment require IL-1 and TNF receptor signaling during pneumococcal pneumonia. *J Immunol.* 2005;175(11):7530-5.

Kanter M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Proc Nutr Soc.* 1998;57(1):9–13.

Knapp S, Leemans JC, Florquin S, Branger j, Maris NA, Pater J, Van Rooijen N, Van der Poll T. Alveolar macrophages have a protective anti-inflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(2):171-9.

Knapp S, Schultz M, Van der Poll T. Pneumonia models and innate immunity to respiratory bacterial pathogens. *Shock.* 2005;24(Suppl1):12-8.

Kawanishi N, Yano H, Yokogama Y; Suzuki K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue both supression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc Immunol Rev.* 2010;16:105-18.

Kohut ML, Boehm GW, Moynihan JA. Prolonged exercise suppresses antigen-specific cytokine response to upper respiratory infection. *J Appl Physiol.* 2001;90(2):678-84.

Kohut ML, Senchina DS. Reversing age-associated immunosenescence via exercise. *Exerc immunol Rev.* 2004;10:6-41.

Kohut ML, Sim YJ, Yu S, Yoon KJ, Loiacono CM. Chronic exercise reduces illness severity, decreases viral load, and results in greater anti-inflammatory effects than acute exercise during influenza infection. *J Infect Dis.* 2009;200(9):1434-42.

Kolling UK, Hansen F, Braun J, Rink L, Katus HA, Dalhoff K. Leucocyte response and anti-inflammatory cytokines in community acquired pneumonia. *Thorax.* 2001;56(2):121-5.

Kolls J, Lei D, Nelson S, Summer WR, Greenberg S, Beutler B. Adenovirus-mediated blockade of tumor necrosis factor in mice protects against endotoxic shock yet impairs pulmonary host defense. *J Infect Dis.* 1995;171(3):570-5.

Lancaster GI, Khan Q, Drysdale P, Wallace F, Jeukendrup AE, Drayson MR, Gleeson M. The physiological regulation of toll-like receptor expression and function in humans. *J Physiol.* 2005;563(Pt3):945-55.

Lawrence E, Van Eeden S, English D, Hogg JC. Polymorphonuclear leukocyte (PMN) migration in streptococcal pneumoniae: comparison of older PMN with those recently released from marrow. *Am J Respir Cell Moll Biol.* 1996;14(3):217-24.

Lawler JM, Kwak HB, Kim JH, Suk MH. Exercise training inducibility of MnSOD protein expression and activity is retained while reducing prooxidant signaling in the heart of senescent rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296(5):R1496-R1502.

Leonard BE. Inflammation, depression and dementia: are they connected? *Neurochem Res.* 2007;32(10):1749-56.

Li Q, Verma IM. Nf-kB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):725-34.

Liebetanz D, Gerber J, Schiffner C, Schutze S, Klinker F, Jarry H, Nau R, Tauber SC. Pre-infection physical exercise decreases mortality and stimulates neurogenesis in bacterial meningitis. *J Neuroinflammation.* 2012;10(9):168.

Lichtenstern C, Brenner T, Bardenheuer HJ, Weigand MA. Predictors of survival in sepsis: What is the best inflammatory marker to measure? *Curr Opin Infect Dis.* 2012;25(3):328-36.

Lima FA, Ferreira DM, Moreno AT, Ferreira PC, Palma GM, Ferreira JM, Raw I, Miyagi EN, Ho PL, Oliveira ML. Controlled inflammatory response in the lungs are associated with protection elicited by pneumococcal surface protein A-based vaccine against a lethal respiratory challenge with *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19(9):1382-92.

Lima FD, Stamm DN, Della-Pace ID, Dobrachinski F, Carvalho NR, Royes FF, Soares FA, Rocha JB, Gonzalez-Gallego J, Bresciani G. Swimming training induces liver mitochondrial adaptations to oxidative stress in rats submitted to repeated exhaustive swimming bouts. *PLoS One.* 2013;8(2):e55668.

Lowder T, Padgett DA, Woods JA. Moderate exercise protects mice from death due to influenza virus. *Brain Behav Immun.* 2005;19(5):377-80.

Malm C. Exercise immunology: the current state of man and mouse. *Sports Med.* 2004;34(9):555-66.

Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM Jr, Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG; Infectious Diseases Society of America; American Thoracic Society. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis.* 2007;44(Suppl 2):S27-S72.

Marriott HM, Hellewell PG, Cross SS, Ince PG, Whyte MK, Dockrell DH. Decreased alveolar macrophage apoptosis is associated with increased pulmonary inflammation in a murine model of pneumococcal pneumonia. *J Immunol.* 2006;177(9):6480-8.

Marriot HM, Jackson LE, Wilkinson TS, Simpson AJ, Mitchell TJ, Buttle DJ, Cross SS, Ince PG, Hellewell PG, Whyte MKB, Dockrell DH. Reactive oxygen species regulate neutrophil recruitment and survival in pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(8):887-95.

Marthur M, Pedersen BK. Exercise as a mean to control low-grade inflammation. *Mediators Inflamm.* 2008;2008:109502.

Matthews CE, Ockene IS, Freedson PS, Rosal MC, Merriam PA, Hebert JA. Moderate to vigorous physical activity and risk of upper-respiratory tract infection. *Med Sci Sports Exerc.* 2002;34(8):1242-8.

Maynard CL, Weaver CT. Diversity in the contribution of IL-10 to cell-mediated immune regulation. *Immunol Rev.* 2008;226:219-33.

Mehrad B, Standiford TJ. Role of cytokines in pulmonary antimicrobial host defense. *Immunol Res.* 1999;20(1):15-27.

Mendes FA, Almeida FM, Cukier A, Stelmach R, Jacob-Filho W, Martins MA, Carvalho CR. Effects of aerobic training on airway inflammation in asthmatic patients. *Med Sci Sports Exerc.* 2011;43(2):197-203.

Mendes FA, Gonçalves RC, Nunes MP, Saraiva-Romanholo BM, Cukier A, Stelmach R, Jacob-Filho W, Martins MA, Carvalho CR. Effects of aerobic training on psychosocial morbidity and symptoms in patients with asthma: a randomized clinical trial. *Chest.* 2010;138(2):331-7.

Mendes FA, Lunardi AC, Silva RA, Cukier A, Stelmach R, Martins MA, Carvalho CR. Association between maximal aerobic capacity and psychosocial factors in adults with moderate-severe asthma. *J Asthma.* 2013;50(6):595-9.

Mohler J, Azoulay-Dupuis E, Amory-Rivier C, Mazoit JX, Béds JP, Rieux V, Moine P. *Streptococcus pneumoniae* strain-dependent lung inflammatory response in a murine model of pneumococcal pneumonia. *Intensive Care Med.* 2003;29(5):808-16.

Mokdad AH, Marks JS, Stroup DF, Gerberding JL. Actual causes of death in the United States. *JAMA*. 2004;291(10):1238-45.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.

Mortola JP, Noworaj A. Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow in small animals. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1983;55(1Pt1):250-3.

Murphy EA, Davis JM, Brown AS, Carmichael MD, Ghaffar A, Mayer EP. Effect of IL-6 deficiency on susceptibility to HSV-1 respiratory infection and intrinsic macrophage antiviral resistance. *J Interferon Cytokine Res*. 2008;28(10):589-95.

Murphy EA, Davis JM, Carmichael MD, Gangemi JD, Ghaffar A, Mayer EP. Exercise stress increases susceptibility to influenza infection. *Brain Behav Immun*. 2008;22(8):1152-5.

Nakao C, Ookawara T, Kizaki T, Oh-Ishi S, Miyazaki H, Haga S, Sato Y, Ji LL, Ohno H. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. *J Appl Physiol* (1985). 2000;88(2):649-54.

National Research Council of The National Academies. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D.C. Eighth edition, 2011.

Nelson S, Bagby GJ, Bainton BG, Wilson LA, Thompson JJ, Summer WR. Compartmentalization of intra-alveolar and systemic lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and the pulmonary inflammatory response. *J Infect Dis.* 1989;159(2):189-94.

Nelson S, Bagby GJ, Summer WR. Anti-tumor necrosis factor- α antibody suppresses pulmonary antibacterial defenses. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143: S393.

Nieman DC. Exercise, infection and immunity. *Int J Sports Med.* 1994;15(3): S131-S141.

Nieman DC. Exercise immunology: practical applications. *Int J Sports Med.* 1997;18(Suppl1):S91–S100.

Nieman DC. Marathon training and immune function. *Sports Med.* 2007;37(4-5):412-5.

Nieman DC, Johanssen Lm, Lee JW, Arabatzis K. Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. *J Sports Med Phys Fitness.* 1990;30(3):316-28.

Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SL, Markoff PA, Balk-Lamberton AJ, Yang H, Chritton DB, Lee JW, Arabatzis K. The effects of moderate exercise training on natural killer cells and acute upper respiratory tract infections. *Int J Sports Med.* 1990;11(6):467-73.

Nunes RB, Alves JP, Kessler LP, Lago PD. Aerobic exercise improves the inflammatory profile correlated with cardiac remodeling and function in chronic heart failure rats. *Clinics*. 2013;68(6):876-82.

Olivo CR, Vieira RP, Arantes-Costa FM, Perini A, Martins MA, Carvalho CR. Effects of aerobic exercise on chronic allergic airway inflammation and remodeling in guinea pigs. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012;182(2-3):81-7.

Ozaki T, Maeda M, Hayashi H, Nakamura Y, Moriguchi H, Kamei T, Yasuoka S, Ogura T. Role of alveolar macrophages in the neutrophil-dependent defense system against *Pseudomonas aeruginosa* infection in the lower respiratory tract. *Am Rev Resp Dis*. 1989;140(6):1595-601.

Pedersen BK, Edward F. Adolph Distinguished Lecture: Muscle as an endocrine organ: IL-6 and other myokines. *J Appl Physiol*. 2009;107(4):1006-14.

Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev*. 2008;88(4):1379-406.

Pedersen BK, Saltin B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sports*. 2006;16(Suppl1):3-63.

Peters EM, Bateman ED. Ultramarathon running and URTI: an epidemiological survey. *S Afr Med J*. 1983;24(7):582-4.

Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effects of exercise. *J Appl Physiol.* 2005;98(4):1154-62.

Pletz MW, Von Baum H, Van der Linden M, Rohde G, Schutte H, Suttorp N, Welte T. The burden of pneumococcal pneumonia-experience of the german competence network CAPNETZ. *Pneumologie.* 2012;66(8):470-5.

Pollock JD, Williams DA, Gifford MA, Li LL, Du X, Fisherman J, Orkin SH, Doerschuk CM, Dinauer MC. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet.* 1995;9(2):202-9.

Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 2008;88(4):1243–76.

Pradhan AD, Manson JEm Rifal N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6 and risk of developing type 2 *diabetes mellitus*. *JAMA.* 2001; 286(3):327-34.

Radák Z, Apor P, Pucsok J, Berkes I, Ogonovszky H, Pavlik G, Nakamoto H, Goto S. Marathon running alters the DNA base excision repair in human skeletal muscle. *Life Sci.* 2003;72(14):1627–33.

Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(2):153-9.

Ramos DS, Olivo CR, Quirino Santos Lopes FD, Toledo AC, Martisn MA, Lazo Osório RA, Dolhnikoff M, Ribeiro W, Vieira RP. Low-intensity swimming training partially inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Med Sci Sports Exerc.* 2010;42(1):113-9.

Ricciardolo FL, Di Stefano A, Sabatini R, Folkerts G. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol.* 2006;533(1-3):240-52.

Ross R, Bradshaw AJ. The future of obesity reduction: beyond weight loss. *Nature Rev Endocrinol.* 2009;5(6):319-25.

Saini A, Harjai K, Chhibber S. Sea-cod oil supplementation alters the course of *Streptococcus pneumoniae* infection in BALB/C mice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30(3):393-400.

Schultz MJ, Van der Poll T. Modulation of pulmonary innate immunity during bacterial infection: animal studies. *Arch immunol Ther Exp (Warsz).* 2002;50(3):159-167.

Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore).* 2000;79(3):170–200.

Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports and Exerc.* 2001;33(3):368–70.

Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils on lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141(2):471-501.

Silva AC, Vieira RP, Nisiyama M, Santos AB, Perini A, Mauad T, Dolhnikoff M, Martins MA, Carvalho CR. *Int J Sports Med.* 2012;33(5):402-9.

Silva RA, Almeida FM, Olivo CR, Saraiva-Romanholo BM, Martins MA, Carvalho CR. Airway remodeling is reversed by aerobic training in a murine model of chronic asthma. *Scand J Med Sci Sports.* 2014 Aug 24. [Epub ahead of print].

Silva RA, Vieira RP, Duarte AC, Lopes FD, Perini A, Mauad T, Martins MA, Carvalho CR. Aerobic training reverses airway inflammation and remodelling in na asthma murine model. *Eur Respir J.* 2010;35(5):334-1002.

Sossdorf M, Fischer J, Meyer S, Dahlke K, Wissuwa; Seidel C, Schrepper A, Bockmeyer CL, Lupp A, Neugebauer S, Schmerler D, Rodel J, Claus RA, Otto GP. Physical exercise induces specific adaptations resulting in reduced organ injury and motality during severe polymicrobial sepsis. *Crit Care Med.* 2013;41(10):e246-55.

Standiford TJ, Kunkel SL, Greenberger MJ, Laichalk LL, Strieter RM. Expression and regulation of chemokines in bacterial pneumonia. *J Leukoc Biol.* 1996;59(1):24-8.

Starkie R, Ostrowski SR, Jauffred S, Febbraio M, Pedersen BK. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans. *FASEB J*. 2003;17(8):884-6.

Stensberg A, Fischer CP, Keller C, Moller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1 α , IL-10 and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285(2):E-433-7.

Stegenga ME, Florquin S, de Vos AF, Van der Poll T. The thiazolidinedione ciglitazone reduces bacterial outgrowth and early inflammation during *Streptococcus pneumoniae* pneumonia in mice. *Crit Care Med*. 2009;37(2):614-618.

Sporri R, Joller N, Hilbi H, Oxenius A. A novel role for neutrophils as critical activators of NK cells. *J Immunol*. 2008;181(10):7121-30.

Takashima K, Tateda K, Matsumoto T, Iizawa Y, Nakao M, Yamaguchi K. Role of tumor necrosis factor- α in pathogenesis of pneumococcal pneumonia in mice. *Infect Immun*. 1997;65(1):257-60.

Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Sem Immunol*. 2004;16(1):3-9.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-76.

Toledo AC, Magalhaes RM, Hizume DC, Vieira RP, Biselli PJC, Moriya HT, Mauad T, Lopes FDTQS, Martins MA. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J.* 2012;39(2):254-64.

Van der Poll T, Keogh CV, Guirao X, Buurman WA, Kopf M, Lowry SF. Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis.* 1997;176(2):439-44.

Van der Poll T, Van Deventer SJ. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin Noth Am.* 1999;13(2):413-26.

Van Rossum AMC, Lysenko ES, Weiser JN. Host and bacterial factors contributing to the clearance of colonization by *Streptococcus pneumoniae* in a murine model. *Infect Immun.* 2005;73(11):7718-26.

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(9):871-7.

Vieira RP, Toledo AC, Ferreira SC, Santos AB, Medeiros MC, Hage M, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Airway epithelium mediates the anti-inflammatory effects of exercise on asthma. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011;175(3):383-9.

Vieira RP, Toledo AC, Silva LB, Almeida FM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Santos ABG, Rivero SH, Hizume DC, Lopes FDTQS, Olivo CR, Castro-Faria-Neto HC, Martins MA. Anti-inflammatory effects of aerobic exercise in mice exposed to air pollution. *Med Sci Sports Exerc.* 2012;44(7):1227-34.

Wang X, Moser S, Louboutin JP, Lysenko ES, Weiner DJ. Toll-like receptor 4 mediated innate immune response to *Haemophilus influenza* infection in mouse lung. *J Immunol.* 2002;168(2):810-5.

Warburton DE, Nicol C, Bredin SS. Health benefits of physical activity: the evidence. *Can Med Assoc J.* 2006;174(6):801-9.

Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest.* 1963;12:131-55.

Weinberger DM, Trzcinski K, Lu YJ, Bogaert D, Brandes A, Galagan J, Andreson PW, Malley R, Lipsitch M. Pneumococcal capsular polysaccharide structure predicts serotype prevalence. *PLoS Pathog.* 2009;5(6):e1000476.

Welte T, Torres A, Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax.* 2012; 67(1):71-9.

Wilson DO, Johnson P. Exercise modulates antioxidant enzyme gene expression in rat myocardium and liver. *J Appl Physiol.* 2000;88(5):1791–6.

Woods JA; Ceddia MA; Wolters BW; Evans JK; Lu Q; McAuley E. Effects of 6 months of moderate aerobic exercise training on immune function in the elderly. *Mech Ageing Dev.* 1999;109(1):1-19.

Wroe PC, Finkelstein JA, Ray GT, Linder JÁ, Johnson KM, Rifas-Shiman S, Moore MR, Huang SS. Aging population and future burden of pneumococcal pneumonia in the United States. *J Infect Dis.* 2012;205(10):1589-92.

Yudkin JS. Inflammation, obesity, and the metabolic syndrome. *Horm Metab Res.* 2007;39(10):707-9.

Zhang P, Bagby GJ, Stoltz DA, Summer WR, Nelson S. Granulocyte colony-stimulating factor modulates the pulmonary host response to endotoxin in the absence and presence of acute ethanol intoxication. *J Infect Dis.* 1999;179(6):1441-8.