

Resumo

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (ARDS) é caracterizada pela insuficiência respiratória resultante da resposta inflamatória a estímulos diversos, levando a alteração da permeabilidade alvéolo-capilar, edema pulmonar e hipoxemia refratária ao tratamento com oxigênio. Um dos mais importantes mecanismos que determina a gravidade da lesão pulmonar é o dano da barreira alvéolo-capilar, promovida por mediadores inflamatórios. Grande parte do processo inflamatório se dá pela ativação local e sistêmica de citocinas como TNF- α e IL-1 β . O treinamento físico aeróbio de intensidades leve e moderada, apresenta benefícios anti-inflamatórios conhecidos em algumas doenças, entretanto, o número de estudos sobre esses efeitos na ARDS é escasso. O objetivo deste projeto é avaliar os efeitos do treinamento físico de intensidade leve realizado previamente à indução de Lesão Pulmonar Aguda (LPA), num modelo experimental em camundongos. Para tal, serão utilizados 32 camundongos divididos em grupos treinados e sedentários, durante 5 semanas anteriores à indução da LPA. Os parâmetros analisados serão: mecânica pulmonar, inflamação pulmonar, analisada através da coleta do lavado broncoalveolar e da densidade de leucócitos no parênquima pulmonar; edema pulmonar, remodelamento do parênquima pulmonar, níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias e de espécies reativas de oxigênio no lavado broncoalveolar, a expressão de iNOS, 3-nitrotirosina, GP91phox, NF-kB, IFN-gama, MCP-1, IL-2, TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, IL-10, IL-1ra, TGF-beta, VEGF, EGFr pelas células inflamatórias no parênquima pulmonar e também de 8-isoprostano no parênquima pulmonar.

1.0- Introdução

1.1 – Definição e epidemiologia

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (ARDS) é o termo utilizado para designar a insuficiência respiratória proveniente da inflamação que cursa com alteração da permeabilidade alvéolo-capilar, edema pulmonar e hipoxemia refratária a altos fluxos de oxigênio (Geiser, 2003; KISS, Kaapa, Savunen, 2007). Embora diferentes causas de ARDS resultem em uma patologia uniforme no último estágio, evidências indicam que a fisiopatologia pode diferenciar de acordo com o tipo de insulto primário. Assim, duas formas de ARDS têm sido descritas:

- a) SARA por lesão direta das células epiteliais pulmonares (ARDS intrapulmonar);
- b) SARA refletindo um envolvimento pulmonar secundário a uma resposta inflamatória sistêmica, tendo na célula endotelial pulmonar, o centro da lesão (ARDS extrapulmonar) (Santos, 2006).

Os índices de prevalência e mortalidade entre as duas causas podem variar, entretanto, os dados mostram que, a ARDS do tipo intrapulmonar possui ambos os índices significativamente maiores (Eisner, 2001).

A pneumonia é a maior causa de lesão pulmonar direta, seguida por aspiração do conteúdo gástrico e traumas pulmonares. A ARDS extrapulmonar encontra na septicemia, a sua principal causa (Rocco, 2008).

1.2 – ARDS processo inflamatório.

A resposta inflamatória na ARDS cursa com recrutamento e ativação de um grande número de neutrófilos e monócitos para o espaço aéreo distal do pulmão e a liberação de moléculas pró-inflamatórias como citocinas, radicais livres, fatores endoteliais e proteases (Kosmidou, 2008; Menezes, 2005), seguido da formação de edema com baixas pressões por aumento da permeabilidade capilar (Kosmidou, 2008).

A interleucina 8 (IL-8) é o principal fator quimiotático para neutrófilos nos pulmões e altas concentrações desta citocina têm sido observadas no lavado

broncoalveolar de pacientes com ARDS (Donnelly, 1993; Wendel et al., 2008). Estudos experimentais demonstram que em modelos de sepsis, a cascata de citocinas consiste em TNF- α , IL-1 β e IL-8 (Petersen, Pedersen, 2005). As duas primeiras citocinas da cascata são TNF- α e a IL-1 β , sendo produzidas localmente. Essas citocinas são usualmente referidas como pró-inflamatórias e tanto o TNF- α como a IL-1 β , estimulam a produção de IL-6 e ambas (IL-1 β e IL-6) podem apresentar papel pró-inflamatório e anti-inflamatório.

O TNF- α tem sido reportado como um importante modulador na lesão pulmonar aguda (Wendel et al., 2008), e injeções intravenosas de TNF- α induzem à lesão pulmonar aguda com aumento de neutrófilos e da permeabilidade microvascular (Browne, Pitchumoni, 2006). Inúmeros estudos têm demonstrado que o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias é promovido pela sinalização das espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) (Tasaka, 2008; Soltan et al., 2007).

1.3 – Estresse oxidativo e nitrosativo

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como o ânion superóxido (O₂⁻), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o óxido nítrico (NO) e a 3-nitrotirosina têm demonstrado importante papel na fisiopatologia da ARDS (Tasaka, 2008; Sato et al. 2002).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o aumento da produção de EROs e ERNs advém principalmente de neutrófilos e macrófagos ativados via mieloperoxidase (MPO), enzima responsável pela catalização de espécies reativas de oxigênio, assim como do endotélio vascular, do epitélio brônquico e dos pneumócitos (Tasaka, 2008; Sato et al. 2002; Roman, Wendland, Polannczyk, 2007). Esses estudos demonstram que parte dos efeitos deletérios das EROs e ERNs advém de um efeito direto sobre as células endoteliais, epiteliais e sobre as proteínas de matriz extracelular e um efeito indireto, por depletarem os níveis das enzimas antioxidantes (Tasaka, 2008, Sato et al. 2002). Entretanto, existe um número reduzido de estudos que avaliaram o papel de diferentes EROs e ERNs, assim como do sistema antioxidante na ARDS, o que torna esse tema extremamente relevante para o melhor entendimento de sua

fisiopatologia (Tasaka, 2008; Sato et al. 2002), considerando que as EROs e ERNs são capazes de estimularem a produção de citocinas, de fatores de crescimento, de fatores endoteliais e de proteases em outras doenças pulmonares (Yao et al., 2007).

Dentre as diversas EROs e ERNs, destaca-se o óxido nítrico, um radical livre liberado por leucócitos, por células epiteliais e endoteliais e que apresenta inúmeras funções nos pulmões como: broncodilatação e manutenção do tônus da musculatura lisa brônquica em concentrações fisiológicas, apresentando também funções pró-inflamatórias que resultam em remodelamento e hiperresponsividade pulmonar (Petersen, Pedersen, 2005); além de interagir com espécies reativas de oxigênio, formando espécies reativas de nitrogênio altamente deletérias (Tasaka, 2008; Yao et al., 2007; Sugiura, 2008).

Como parte do mecanismo de defesa contra a ação das EROs e ERNs, o organismo dispõe de um complexo sistema de enzimas antioxidantes, composto principalmente pela catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPX). A GPX utiliza peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos, protegendo membranas e componentes celulares das consequências do stress oxidativo (Singh et al., 2006). O número de estudos sobre o sistema antioxidante na ARDS é reduzido e um melhor entendimento dos seus efeitos no curso da doença, poderia contribuir para um melhor entendimento sobre a sua fisiopatologia.

1.4 - Processo Fibrótico, Proteases e Fatores de Crescimento

O processo de reparação pulmonar inicia-se na primeira fase da ARDS. Alguns trabalhos demonstram que a inibição de IL-1 β pelo antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra), reduz a reparação epitelial in vitro, enquanto o bloqueio do TNF- α , não promove efeito, o que sugere que a IL-1 β media a maior fração desta recuperação (Browne, Pitchumoni, 2006).

O TGF- α é elevado no edema pulmonar de pacientes que desenvolvem ARDS (Browne, Pitchumoni, 2006), sugerindo que os fatores: de crescimento epidérmico

(EGF), de transformação e crescimento alfa (TGF- α) e o receptor de fator de crescimento epidermal (EGFr), podem regular a reparação epitelial in vitro e in vivo.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) está associado a processos fibróticos, permeabilidade vascular e na formação de edema na ARDS; sendo liberado pelo endotélio vascular, por leucócitos e pelo epitélio brônquico (Medford, Millar, 2006).

A atividade dos fatores de crescimento, bem como o balanço entre atividades pró-coagulantes e anticoagulantes e as atividades fibrinolíticas no pulmão, controlam o grau de deposição de fibrina alveolar através do controle do balanço entre as metaloproteases de matriz (MMPs) e os inibidores das metaloproteases (TIMPs) (Medford, Millar, 2006; Fan, 2000).

1.5 - Fatores Envolvidos na Coagulação

A inflamação sistêmica está associada com a ativação da coagulação e o sistema fibrinolítico (Kanno et al., 1995). O maior iniciador da ativação da cascata de coagulação é o fator tecidual (TF), sendo o receptor e cofator para o fator de coagulação VII no plasma, gerando manifestações trombóticas. (Franco et al., 2000; Busch et al., 2005). O TF é induzido por mediadores inflamatórios como a IL-6, IL-8, e MCP1 (Busch et al., 2005).

Normalmente, o TF é expresso em células em contato direto com o sangue, mas pode ser expresso em células intravasculares principalmente monócitos e células endoteliais quando ativadas especialmente por estímulos inflamatórios (Franco et al., 2000).

1.6 – Fatores endoteliais

Além dos radicais livres, outros mediadores endoteliais são responsáveis pela lesão pulmonar, aumentando a permeabilidade vascular, promovendo edema tecidual ou ainda, causando vasoconstrição.

A ICAM e VCAM são moléculas de adesão sintetizadas pelas células endoteliais vasculares, e representam proteínas de membrana da família de imunoglobulinas, sendo requeridas para atração de leucócitos na área inflamada, principalmente em situações de hipóxia (Ohga et al., 2003).

A endotelina (ET) é um potente vasoconstrictor, induzindo hipertensão pulmonar, broncoconstrição e produção de VEGF, sendo este bem conhecido por aumentar a permeabilidade vascular (Donaubauer, 2006).

Modelos experimentais de ARDS mostram que o tratamento com antagonistas de endotelina 1 (ET-1) reduz a inflamação e permeabilidade vascular (Carpenter, 2005).

A Angiopietina-1 (Ang-1) é um fator endotelial que desempenha papel anti-inflamatório, protegendo os vasos sanguíneos, diminuindo a permeabilidade, a adesão de leucócitos no endotélio e reduzindo a expressão do fator tecidual e de moléculas de adesão por células endoteliais (McCarter, 2006). Os efeitos do treinamento físico na expressão de angiopietina em modelos de ARDS nunca foram avaliados.

1.7 – Adenosina Trifosfato (ATP) e Receptores Purinérgicos

Embora o número de estudos sobre o papel do ATP e dos receptores purinérgicos na ARDS seja reduzido, eles demonstraram que durante o processo de estresse celular em modelos experimentais de ARDS, ocorre aumento da liberação de ATP para o espaço extracelular (ATP e Hipóxia).

Concentrações elevadas de ATP no extracelular resultam em ativação dos receptores purinérgicos da classe P2X e P2Y (ATP e hipóxia), os quais sinalizam para a produção de inúmeros mediadores pró-inflamatórios (Idzko, 2007). Esses

estudos demonstram que a ativação dos receptores purinérgicos resulta em ativação de diversas células, como: neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e células dendríticas. Por outro lado, uma possível resposta do exercício físico na modulação destes receptores, no modelo de ARDS, é desconhecido.

1.8 - Treinamento Físico Aeróbico

A atividade física é considerada aeróbica quando a maior parte da demanda energética é suprida através do metabolismo aeróbico e normalmente realizada com intensidade de até aproximadamente 70% do consumo máximo de oxigênio (Petersen, Pedersen, 2005; Vieira et al., 2007).

A atividade física aeróbica realizada de maneira sistemática e regular desencadeia uma série de adaptações crônicas benéficas para o organismo, tais como: redução da pressão arterial e da frequência cardíaca de repouso em indivíduos hipertensos (Petersen, Pedersen, 2005; Vieira et al., 2007), aumento do consumo máximo de oxigênio, aumento da massa muscular e densidade óssea (Petersen, Pedersen, 2005), aumento da resposta imunológica (Malm, 2004) e da expressão e atividade das enzimas antioxidantes (Mussi et al., 2008; Rush, 2000).

1.9 - Treinamento Físico Aeróbico – Efeitos Anti-inflamatórios

Os efeitos anti-inflamatórios da atividade física aeróbica têm sido extensivamente investigados em inúmeras patologias e durante a senilidade (Petersen, Pedersen, 2005).

De maneira geral, a literatura afirma que a atividade aeróbica de alta intensidade e longa duração desencadeia uma resposta pró-inflamatória, enquanto as atividades de leve e moderada intensidade, desencadeiam respostas anti-inflamatórias (Mussi et al., 2008; Petersen, Pedersen, 2005).

Os efeitos imunomodulatórios da atividade física podem ser observados em casos de aterosclerose, diabetes, câncer de cólon e de mama, e de doenças cardíacas isquêmicas (Petersen, Pedersen, 2005).

Estes estudos demonstram que as respostas são reguladas por inúmeras citocinas e/ou quimiocinas dentre elas: IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1, NAP-1, G-CSF (Malm, 2004; Petersen, Pedersen, 2005).

No ano de 2008, Mussi et al., submetem ratos a corridas moderadas, por 60 minutos, 5 vezes por semana, durante 8 semanas. Após o treinamento, induziram os grupos treinados e não treinados, a um procedimento de isquemia/reperfusão.

O grupo treinado apresentou uma diminuição da permeabilidade vascular, observada pela diminuição do extravasamento de proteínas. Além disso, o treinamento resultou na diminuição dos níveis de TNF- α e IL-1 β . Os níveis de IL-10 permaneceram inalterados, assim como o número de polimorfonucleares no tecido pulmonar. Os níveis de SOD bem como de MPO foram significativamente mais altos no grupo treinado quando comparados ao grupo sedentário.

A atividade física aeróbica é capaz de modular tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo (Costa Rosa, 2002; Malm, 2004). Os mecanismos que modulam essas respostas são dependentes dos efeitos hormonais, metabólicos e mecânicos (Costa Rosa, 2002). Embora o exercício seja frequentemente classificado como estímulo estressante, as respostas desencadeadas obedecem a dois cursos: a resposta aguda e a adaptação crônica (Costa Rosa, 2002). De acordo com Costa Rosa, “A resposta aguda é a reação transitória ao estresse, enquanto o estímulo crônico gera a resposta de adaptação crônica ao exercício, habilitando o organismo a tolerar de maneira mais adequada o estresse” (Costa Rosa, 2002).

Diversos estudos demonstram que a realização de exercícios induz a liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-1ra, IL-10 e sTNF-R; normalmente seguidas pela liberação de IL-6 (Malm, 2004; Petersen, Pedersen, 2005).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que inibe a produção de mediadores pró-inflamatórios como: o TNF- α , IL-6 e IL-1 β ; além de estimular a síntese do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra).

Estudos sugerem que o aumento de IL-10 durante o exercício físico ocorre pelos músculos esqueléticos ativados, por leucócitos e células do epitélio brônquico; efeitos já demonstrados em modelos experimentais de asma (Petersen, Pedersen, 2005). Até o momento, nenhum estudo avaliou se os efeitos anti-inflamatórios do treinamento físico, num modelo de ARDS, são mediados pela liberação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e IL-1ra.

2.0 - Justificativa e Hipótese

Um dos fatores determinantes da gravidade da lesão pulmonar na ARDS, é a magnitude da lesão da barreira alvéolo-capilar.

Apesar da ventilação mecânica exercer protagonismo no tratamento, com resultados positivos já estabelecidos, algumas modalidades terapêuticas preconizadas na atualidade, visam diminuir a inflamação pulmonar a fim de minimizar a lesão inicial (Mussi et al., 2008).

Sabendo-se que parte do processo inflamatório se dá pela ativação local e sistêmica de citocinas como o TNF- α e a IL-1 β , e que exercícios aeróbicos de intensidades leve e moderada têm demonstrado possuir efeito na diminuição destas citocinas, hipotetizamos que sessões de exercícios aeróbicos de intensidade leve realizados previamente à indução experimental de ARDS poderão resultar em uma resposta atenuada à lesão pulmonar (inflamação, remodelamento e alteração da função pulmonar).

3.0 - Objetivos gerais:

Avaliar os efeitos da atividade física aeróbica de intensidade leve realizada previamente à indução de um modelo experimental de ARDS em camundongos.

3.1 – Objetivos específicos:

Avaliar os efeitos da atividade física aeróbica de intensidade leve, realizada durante 5 semanas anteriores à indução experimental de SARA, sobre os seguintes parâmetros:

- mecânica pulmonar
- marcadores de inflamação pulmonar
- marcadores de estresse oxidativo pulmonar
- remodelamento pulmonar
- níveis de ATP no lavado broncoalveolar
- expressão dos receptores purinérgicos P2X e P2Y por células inflamatórias no parênquima pulmonar.

4.0 - Materiais e Métodos

4.1 - Animais e Grupos Experimentais:

Serão utilizados 32 camundongos machos da linhagem BALB/c, adultos jovens, com 06 semanas de idade, pesando aproximadamente 18-20 g.

Os animais serão obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos em condições controladas de temperatura (22-25°C) e luminosidade (ciclo 12h claro/ 12h escuro), e 70 % de umidade relativa. A alimentação constará de água e ração “ad libitum” (Purina Labina®, São Paulo, Brasil).

Os animais serão divididos em 4 grupos:

1 – Controle (Co): animais submetidos a 5 semanas de repouso; após este período receberão administração intra-traqueal de NaCl 0,9%, e serão sacrificados 24 horas após esta administração.

2 – Exercício Aeróbio Prévio (PRÉ): animais submetidos ao treinamento físico aeróbio de intensidade leve (50% da máxima capacidade física) durante 5 semanas. Após 24 horas do último teste físico, os animais receberão administração intra-traqueal de NaCl 0,9%, e serão sacrificados 24 horas após esta administração.

3 – Lesão Pulmonar Aguda (LPS): animais submetidos a 5 semanas de repouso; receberão administração intra-traqueal de LPS E. Coli (200µg/animal), e serão sacrificados 24 horas após essa administração.

4 – Exercício Aeróbio Prévio + Lesão Pulmonar Aguda (PRÉ+LPS): animais submetidos previamente ao treinamento físico aeróbio de intensidade leve (50% da máxima capacidade física) durante 5 semanas, submetidos à administração intratraqueal de E. Coli LPS (200µg/animal). 24 horas após o término do último teste físico e da administração de LPS, os animais serão sacrificados.

4.2 - Indução da Lesão Pulmonar Aguda (LPS):

No grupo LPS e PRÉ+LPS, os animais receberão E. coli LPS (026:B6, 200µg it.) suspenso em solução salina com volume de 0,05 ml. Para instilação intratraqueal, os camundongos serão anestesiados com sevoflurane e em seguida receberão LPS instilado por agulha fina através de uma incisão de cerca de 1 cm na linha média cervical anterior, para exposição da traqueia.

A incisão será suturada com fio 5.0 e os camundongos retornarão para suas gaiolas (Santos et al., 2006).

4.3 - Protocolo de Teste e Treinamento Físico:

O treinamento físico aeróbio será realizado em esteira ergométrica adaptada para camundongos (modelo KT 400, marca Imbramed®, RS, Brasil), por um período de 05 semanas (Vieira et al., 2007). Na semana anterior ao período de treinamento, os animais serão submetidos a 03 dias de adaptação na esteira ergométrica (10 minutos a uma velocidade de 0,2 Km/h (Vieira, 2007).

Quarenta e oito horas após o terceiro dia de adaptação, os animais serão submetidos a um teste de esforço máximo. O teste consiste em 05 minutos de aquecimento a uma velocidade de 0,2 Km/h que será aumentada em 0,1 Km/h a cada 2,5 minutos até a exaustão dos animais.

Os animais serão considerados exaustos quando não conseguirem permanecer correndo mesmo após 10 estímulos mecânicos (Vieira, 2007).

A intensidade do treinamento (leve = 50%) será calculada a partir da velocidade máxima atingida no teste. O treinamento será realizado 03 vezes por semana (segundas, quartas e sextas), 60 minutos por sessão, durante 05 semanas. Após este período, 24 horas antes da administração de salina (grupos controle) e LPS (grupos LPA), o teste físico será repetido com o intuito de reavaliar o condicionamento físico dos animais (Vieira, 2007).

Ressaltamos que a adaptação na esteira e o teste físico inicial e final serão aplicados nos 04 grupos experimentais com o intuito de avaliar se o treinamento físico foi capaz de melhorar o condicionamento físico dos animais.

4.4 - Coleta e Análise do Óxido Nítrico Exalado:

Após anestesia e sob ventilação mecânica (condições descritas no item abaixo), os animais terão um balão de mylar conectados na válvula expiratória do ventilador por um período de 5 minutos. Após os 5 minutos, o balão será retirado, fechado e analisado através do método de quimioluminescência, conforme rotina de nosso laboratório (Prado et al., 2006).

4.5 - Avaliação da Mecânica Pulmonar:

Para avaliação da mecânica, os animais serão anestesiados com Pentobarbital sódico (50 mg/kg, por via intraperitoneal), traqueostomizados com catéter intravascular 20G e conectados a um respirador para pequenos animais (FlexiVent, SCIREQ, Montreal, Canadá). Os animais serão ventilados com um volume corrente de 10 ml/Kg e frequência respiratória de 120 ciclos/minuto.

Será utilizado um PEEP de 5 cmH₂O, conectado à válvula expiratória do ventilador. Posteriormente será induzida uma paralisia muscular através de uma injeção intraperitoneal de Brometo de Pancurônio (1mg/Kg) e serão avaliadas, através de técnica de oscilação forçada e de fase constante (Hantos et al., 1992), as medidas: Raw (resistência das vias aéreas), law (inertância das vias aéreas), Gtis (resistência do tecido pulmonar) e Htis (elastância do tecido pulmonar), conforme rotina do nosso laboratório (Lopes, 2007).

4.6 - Coleta e Análise do Sangue:

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

4.7 - Coleta e Análise do Lavado Broncoalveolar (LBA):

Após a coleta do sangue, ainda canulados, os pulmões serão lavados com 1,5 ml (3x 0,5 ml) de soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%) e 1,0 ml do LBA será recuperado (Vieira, 2007).

4.8 - Análise dos Níveis de ATP no LBA:

Imediatamente após a coleta do LBA, 200ul serão coletados e armazenados em nitrogênio líquido. Os níveis de ATP serão avaliados através de técnica de quimioluminescência utilizando-se o kit ATPLite (Perkim Elmer®) (Idzko, 2007).

4.9 - Análise dos Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio:

Imediatamente após a coleta do LBA, 400 microlitros do LBA fresco serão imediatamente utilizados para a análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), através de técnica de quimioluminescência. A quimioluminescência será medida por 5 minutos a 37°C, segundo adaptação da técnica de (Cocuzza, 2007). Os resultados são expressos em fótons contados por minuto, por número de células x 10⁵.

4.10 - Análise do Número de Células Totais e Diferenciais:

Para esta análise, 400 ul serão centrifugados (1000 rpm, durante 10 minutos) a 05°C, e o sobrenadante coletado e armazenado a – 70° C para análises futuras. O botão de células será ressuspendido em 0,4ml de soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%) e utilizado para avaliação do número de células total e diferencial. Vinte microlitros serão utilizados para contagem do número total de células com auxílio de uma câmara de newbauer (Vieira et al., 2007; Vieira, 2007).

Duzentos microlitros serão utilizados para contagem diferencial após centrifugação (06 min, 450 rpm) (modelo Cytospin-2, Shandon Instruments Sewickley, PA) e coloração das lâminas com May-Grun-wald-Giemsa. Serão contadas 300 células por lâmina (Vieira et al., 2007; Vieira, 2007).

4.11 - Análise do Número de Células Totais e Diferenciais:

Para esta análise, 400 ul serão centrifugados (1000 rpm, durante 10 minutos) a 05°C, e o sobrenadante coletado e armazenado a – 70° C para análises futuras. O botão de células será ressuspendido em 0,4ml de soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%) e utilizado para avaliação do número de células total e diferencial. Vinte microlitros serão utilizados para contagem do número total de células com auxílio de uma câmara de newbauer (Vieira et al., 2007; Vieira, 2007).

Duzentos microlitros serão utilizados para contagem diferencial após centrifugação (06 min, 450 rpm) (modelo Cytospin-2, Shandon Instruments Sewickley, PA) e coloração das lâminas com May-Grun-wald-Giemsa. Serão contadas 300 células por lâmina (Vieira et al., 2007; Vieira, 2007).

4.12 - Análise dos Níveis de Mediadores Pró-inflamatórios e Anti-inflamatório:

Os níveis de mediadores pró-inflamatórios (IL-1beta, IL-6, KC (IL-8), TNF-alfa) e anti-inflamatórios (IL-1ra e IL-10), serão avaliadas no sobrenadante do LBA através de kits comerciais de ELISA (Bozza, 2007).

4.13 - Histologia:

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

4.14 - Avaliação da Inflamação no Parênquima Alveolar:

A avaliação da densidade de células polimorfonucleares, mononucleares e células inflamatórias positivas para os anticorpos será realizada através de morfometria convencional. Serão avaliados 15 campos do parênquima de cada animal, escolhidos de maneira aleatória, num aumento de 400x. A área de tecido pulmonar será calculada a partir do número de pontos que incidirem nos septos alveolares. A densidade das células será determinada como o número de células positivas nos septos alveolares dividido pela área mensurada. A densidade das células será expressa em células/ μm^2 e os resultados serão transformados para cells/ mm^2 , ajustando-se as unidades (Vieira et al., 2007; Vieira, 2007).

4.15 - Imunohistoquímica:

As lâminas previamente preparadas com (3-Aminopropil-trietoxissilano) (Silane) contendo os cortes histológicos dos pulmões serão inicialmente desparafinadas, hidratadas e submetidas às reações com os anticorpos primários para as seguintes avaliações:

Estresse Oxidativo e Nitrosativo: expressão de GP91phox, 3-nitrotirosina, iNOS pelas células inflamatórias no parênquima alveolar (Vieira, 2007) e a expressão de 8-isoprostano no parênquima pulmonar (Angeli et al., 2008).

Enzimas antioxidantes: expressão de SOD-1 e GPX pelas células inflamatórias no parênquima alveolar (Vieira, 2007).

Receptores Purinérgicos: expressão dos receptores P2X e P2Y pelas células inflamatórias no parênquima alveolar.

4.16 - Avaliação do Remodelamento do Parênquima Alveolar:

A proporção do volume de fibras colágenas (coloração com Picrossírius) e elásticas (Resorcina Fucsina com Oxidação) será determinada analisando-se 15 campos de parênquima de cada animal escolhidos de maneira aleatória, avaliados num aumento de 400x. A proporção de volume de fibras colágenas e elásticas será calculada como a relação entre o número de pontos que incidirem sobre fibras colágenas ou elásticas e o número de pontos que incidirem nos septos alveolares.

Os resultados serão expressos como porcentagem (Vieira et al., 2007; Vieira, 2007).

5.0 – Cronograma

Trimestres	1	2	3	4	5	6	7	8
Atividades								
Levantamento Bibliográfico	x	x	x	X	x	x	x	X
Protocolo Experimental	x	x	x	X	X	x		
Análise do Material		x	x	X	x	x	X	X
Redação dos Artigos						x	x	
Redação da Tese					x	x	x	X

6.0 – Referências Bibliográficas

- 1- Angeli, P. et al. Effects of chronic L-NAME treatment lung tissue mechanics, eosinophilic and extracellular matrix responses induced by chronic pulmonary inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. v. 294, n. 6, p. L1197-205, 2008.
- 2- Bozza, F. A. Cytokine profile as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Critical Care*. v. 11, n. 2, p.1- 8, 2007.
- 3- Browne, G.W.; PITCHUMONI, C.S. Pathophysiology of pulmonary complications of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. v.12, n. 44, p. 7087-7096, 2006.
- 4- Brower R.G. et al. Treatment of ARDS. *Chest*. v. 120, p.1347-1367, 2001.
- 5- Busch, G. et al. Coagulation factor Xa stimulates interleukin-8 release in endothelial cells and mononuclear leukocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. v. 25, p. 461-466, 2005.
- 6- Carpenter, T. C; Schomberg, S.; Stenmark R. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. v. 289, p. L1075-L1082, 2005.
- 7 -Cocuzza, M. Impact of clinical varicocele and testis size on seminal reactive oxygen species levels in a fertile population: a prospective controlled study. *Fertil Steril*. v. 15, 2007.
- 8- Cocuzza, M. Age-related increase of reactive oxygen species in neat semen in healthy fertile men. *Urology*.v.71, n. 3, p. 90 - 4, 2008.
- 9- Costa Rosa, L.F.P.B. Influência do exercício na resposta imune. *Rev Bras Med Esporte*. v.8, n. 4, 2002.

- 10- Donaubauer, B. et al. Low-Dose Inhalation of an Endothelin-A Receptor Antagonist in Experimental Acute Lung Injury: ET-1 Plasma Concentration and Pulmonary Inflammation. *Experimental Biology and Medicine*. 231: 960-966, 2006.
- 11- Donnelly, E. J. et al. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet*. v. 341, p. 643-647, 1993.
- 12- Eckle, T. et al. Identification of Ectonucleotidases CD39 and CD73 in Innate Protection during Acute Lung Injury. *The Journal of Immunology*.v. 178, p. 8127-8137, 2007.
- 13- Eisner, M. D. et al. Efficacy of low tidal volume ventilation in patients with different clinical risk factors for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. v. 164, p. 231-236, 2001.
- 14- Fan, J. et al. Priming for enhanced alveolar fibrin deposition after hemorrhagic shock- Role of tumor necrosis factor. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 22, p. 412- 421, 2000.
- 15- Franco, R. F et al. The in vivo kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation. *Blood* v. 96, p. 554-560, 2000.
- 16 - Geiser, T. Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury – a translational approach. *Swiss Med WKLY.*; v. 133, n.1, p. 586-590, 2003.
- 17 - Hantos Z. et al. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol*. v. 72, n.1, p. 168-78, 1992

18- Idzko, M. et al. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nature Medicine*. v. 13, n.8, p. 913-919, 2007.

19 - Ipaktchi, K. et al. Attenuating burn wound inflammatory signaling reduces systemic inflammation and acute lung injury. *The Journal Of Immunology*, v.177, p. 8065-8071, 2006.

20 - Kanno, K. et al. Urinary excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus. *The New England Journal of Medicine*. v. 332, p. 1540-1546, 1995.

21- Kiss, J.; Kaapa, P.; Savunen, T. Antioxidants combined with NO donor enhance systemic inflammation in acute lung injury in rats. *Scandinavian Cardiovascular Journal*. v. 41, p. 186-191, 2007.

22 - Klein, T. et al. Generation of the isoprostane- 8 epi- prostaglandin F₂ α in vitro and in vivo via the cyclooxygenases. *The Journal Of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v. 282, 1658-1665, 1997.

23- Kolosova, I. A. et al. Protective effect of purinergic agonist ATPYs against acute lung injury. *Am Physiol Lung Cell Mol Physiol*. p. 1-23, 2007.

24 - Kosmidou, I. et al. Vascular endothelial growth factors in pulmonary edema: an update. *J Thromb Thrombolysis*. 25: 259-264, 2008.

25 - Kurdowska, A. et al. Anti-interleukin-8 autoantibodies in patients at risk for acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. v.30, p. 2335- 2337, 2002.

- 26- Lopes, F.D.T.Q.S. O efeito da exposição a níveis ambientais de material particulado no desenvolvimento do enfisema pulmonar em camundongos. 2007, 105 f. Tese- (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- 27- McCarter, S. D. et al. Regulation of Endothelin-1 by Angiopoietin-1: Implications for Inflammation. *Experimental Biology and Medicine*. v. 231, p. 985-99, 2006.
- 28- Malm, C. Exercise immunology. The current state of men and mouse. *Sports Med*. v. 34, n. 9, p. 555-566, 2004.
- 29- Medford, A. R, Millar, A. B. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS): paradox or paradigm? *Thorax*. v. 61, p. 621-626, 2006.
- 30- Menezes S. L. et al. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. *J Appl Physiol*. v. 98, p. 1777-1783, 2005.
- 31- Mussi, R. K. et al. Exercise training reduces pulmonary ischaemia-reperfusion-induced inflammatory responses. *Eur Respir J*. v. 31, p. 645-649, 2008.
- 32- Negri, E. M. et al. Acute remodeling of parenchyma in pulmonary and extrapulmonary ARDS. An autopsy study of collagen-elastic system fibers. *Pathol Res Pract*. v. 198, n. 5, p. 355-361, 2002.
- 33- Novak, I. ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *News Physiol Sci*. v.18, p. 12 -17, 2003.
- 34- Ohga, E. et al. Effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8, and MCP-1. *J Appl Physiol*, v. 94, p. 179-184, 2003.

- 35- Pajkrt, D. et al. Interleukin-10 Inhibits Activation of Coagulation and Fibrinolysis During Human Endotoxemia. *Blood*. v. 89, p. 2701- 2705, 1997.
- 36- Parikh, S. M. et al. Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. *PLoS Med*. v. 3 e 46, 2006.
- 37- Petersen, A. M. W.; pedersen, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol*. v. 98, p. 1154-1162, 2005.
- 38- Prado, C. M. et al. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:457-465, 2006.
- 39- Rocco, P. R, Pelosi, P. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: myth or reality? *Curr Opin Crit Care*. v. 14, p. 50-55, 2008.
- 40- Roman, R. M; Wendland, A. E; Polanczyk, C. A. Mieloperoxidase e doença arterial coronariana: da pesquisa à prática clínica. *Arq Bras Cardiol*.v. 91, p.12-19, 2007.
- 41 - Rush, J. W. E et al. SOD-1 expression in pig coronary arterioles is increased by exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. v. 279, p. H2068-H2076, 2000.
- 42- Santos, F. B. et al. Time course of lung parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. *J Appl Physiol*. v. 100, p. 98-106, 2006.
- 43- Sartory, C.; Matthay, M. A. Alveolar Epithelial fluid transport in acute lung injury: new insights. *Eur Respir J*. v. 20, p. 1299-1313, 2002.

44 - Sato K. et al. In vivo lipid-derived free radical formation by NADPH oxidase in acute lung injury induced by lipopolysaccharide: a model for ARDS. *FASEB J.* v. 16, p. 1713-1720, 2002.

45 - Singh, A. et al. Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke – inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2. *Am J Respir Cell Mol Biol.* v. 35, p. 639-650, 2006.

46 - Soltan-Sharifi M. S. et al. Improvement by N-acetylcysteine of acute respiratory distress syndrome through increasing intracellular glutathione, and extracellular thiol molecules and anti-oxidant power: evidence for underlying toxicological mechanisms. *Hum Exp Toxicol.* v. 26, p. 697-703, 2007.

47- Sugiura H; Ichinose M. Oxidative and nitrate stress in bronchial asthma. *Antioxid Redox Signal*, v. 10, p. 785–797, 2008.

48 - Suntharalingam G., et al. Influence of direct and indirect etiology on acute outcome and 6-month functional recovery in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* v. 29, p. 562-566, 2001.

49- Tasaka, S. Roles of oxidants and redox signaling in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Antioxid Redox Signal.* v. 10p. 739-753, 2008.

50- Vieira, R. P. et al. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* v. 176, p. 1-7, 2007.

51- Vieira, R. P. Efeito do treinamento físico aeróbio sobre a inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos. 2007. 131 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

52- Wendel M, Giessmann U, Behrend P, Augstein A, Koslowski R, Haufe D, Kasper M, Koch T. Inflammatory-activated microvascular endothelial cells regulate interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression of A549 cells in a paracrine fashion. *Exp Lung Res* 34: 85-100, 2008.

53- Yang, Y.; Chen, S.; Ge, X. Role of interleukin-18 in the development of acute pulmonary injury induced by intestinal ischemia/reperfusion and its possible mechanism. *Gastroenterology*. v. 22, p. 253-260, 2007.

54- Yao, H. et al. Redox regulation of lung inflammation: role of NADPH oxidase and NF- κ B signalling. *Biochem Soc Trans*. v. 35, p. 1151-1155, 2007.