

Luana Oliveira Prata

**INFLAMAÇÃO PULMONAR CRÔNICA FIBROSANTE INDUZIDA POR
BLEOMICINA: EFEITO DO EXERCÍCIO AERÓBICO SOBRE A CAPACIDADE
FUNCIONAL E AS LESÕES PULMONARES**

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Belo Horizonte
2011

Luana Oliveira Prata

**INFLAMAÇÃO PULMONAR CRÔNICA FIBROSANTE INDUZIDA POR
BLEOMICINA: EFEITO DO EXERCÍCIO AERÓBICO SOBRE A CAPACIDADE
FUNCIONAL E AS LESÕES PULMONARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de Concentração: Patologia Geral

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari
Universidade Federal de Minas Gerais

Co-orientadora: Prof^a Dra. Maria da Glória
Rodrigues Machado
Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Belo Horizonte
2011



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30130-100
Fone: (031) 3409-9641 - FAX: (31) 3409-9640
epg@medicina.ufmg.br



UFMG

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LUANA OLIVEIRA PRATA, nº de registro 2009655715. Às nove horas do dia 23 de fevereiro de dois mil e onze, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "INFLAMAÇÃO PULMONAR CRÔNICA FIBROSANTE INDUZIDA POR BLEOMICINA: EFEITO DO EXERCÍCIO AERÓBICO SOBRE A CAPACIDADE FUNCIONAL E AS LESÕES PULMONARES", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Marcelo Vidigal Caliari, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação do seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Marcelo Vidigal Caliari/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVAÇÃO</u>
Profa. Maria da Glória Rodrigues Machado/Coorientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVAÇÃO</u>
Profa. Milene Alvarenga Rachid	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVAÇÃO</u>
Profa. Danusa Dias Soares	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVAÇÃO</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada APROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2011.

Prof. Marcelo Vidigal Caliari _____

Profa. Maria da Glória Rodrigues Machado _____

Profa. Milene Alvarenga Rachid _____

Profa. Danusa Dias Soares _____

Prof. Wagner Luiz Tafuri (Coordenador) _____

Prof. Wagner Luiz Tafuri
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Patologia - Faculdade de Medicina/UFMG

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação

P912i Prata, Luana Oliveira.
Inflamação pulmonar crônica fibrosante induzida por bleomicina [manuscrito]: efeito do exercício aeróbico sobre a capacidade funcional e as lesões pulmonares. / Luana Oliveira Prata. - - Belo Horizonte: 2011. 75f.: il.
Orientador: Marcelo Vidigal Caliarí.
Co-Orientadora: Maria da Glória Rodrigues Machado.
Área de concentração: Patologia Geral.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Fibrose Pulmonar Idiopática. 2. Proteína A Associada a Surfactante Pulmonar. 3. Colágeno Tipo I. 4. Exercício. 5. Bleomicina. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Caliarí, Marcelo Vidigal. II. Machado, Maria da Glória Rodrigues. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WF 600

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e, executado nos Laboratórios de Protozooses e de Técnicas Histológicas do Departamento de Patologia Geral/ICB/UFMG.

Dedico esta dissertação aos meus exemplos de vida, de união, amor incondicional, de respeito, de luta e conquistas, meus preciosos pais, Maria do Socorro da Paixão Prata e Eduardo Jorge Prata que sempre me estimularam com muita sabedoria, discernimento, bom senso, amor e dedicação. Estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Minha gratidão não cabe em palavras. Dedico também a meu irmão Wallace Mateus Prata, pelo amor e companheirismo, sua competência e seriedade profissional foram fontes de inspiração para meu crescimento. Obrigada por tudo, amo vocês incondicionalmente.

Agradecimentos

A DEUS e seus mensageiros por me guiarem, me dado força e capacidade para mais esta conquista e por me abençoar com uma família maravilhosa.

A minha família, em especial a Íta, ao tio New, tia Fátima, Karol, Bia, Lincoln, ao meu sobrinho Guilherme, a minha avó Altair (in memorian), minha afilhada Camila, a minha cunhada Olívia, a minha amiga Denise Toca e a todos que sempre estiveram ao meu lado, pelo enorme laço de amor e carinho que nos une. Amo vocês.

Ao professor Marcelo Vidigal Caliari, meu orientador, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade, por todo empenho imensurável, exemplo de sabedoria, compreensão, seriedade, competência, amizade e confiança, objetividade, sempre respeitando minhas iniciativas. Serei eternamente grata.

À professora Maria da Glória Rodrigues Machado, minha co-orientadora, pela oportunidade, competência, ensinamentos e de forma surpreendente marcou essa conquista. Agradeço pelo apoio e dedicação.

Ao professor Geovanni e a professora Mônica, aos quais tenho profunda admiração pela competência e seriedade profissional. O resultado deste processo criativo é que acabamos construindo uma fraternal e cada dia mais sólida amizade, que carregaremos para sempre.

Ao professor Anderson José Ferreira pela ajuda e disponibilidade e a todos os professores da pós-graduação em Patologia.

A todos os amigos do departamento, Keyla, Cássia, Chris Cartelle, Lilinha, Marcos e em especial o Fabrício, que contribuíram com sua força, alegria e estímulo para que eu conseguisse completar este percurso.

Às técnicas e amigas, em especial a Mirna, Vânia, Gislene, a estagiária Tatiana, às secretárias Cristina e Regina pelo apoio, amizade fundamental e excelência profissional.

A todos que colaboraram e à banca examinadora, meus sinceros agradecimentos.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio e financiamento concedidos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença Intersticial Pulmonar	1
1.2 Fibrose Pulmonar Idiopática	3
1.2.1 Patogênese da Fibrose Pulmonar	3
1.2.2 Fibras colágenas, fibrose e remodelamento	4
1.2.3 Proliferação de pneumócitos tipo II e produção de substância surfactante	8
1.3 Alterações funcionais na Fibrose Pulmonar Idiopática	10
1.4 Bleomicina e Doença Intersticial Pulmonar	12
1.5 Reabilitação Pulmonar	14
1.6 Justificativa	18
2 OBJETIVOS	19
2.1 Gerais	19
2.2 Específicos	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Animais	20
3.2 Indução de fibrose pulmonar	21
3.3 Avaliação da capacidade funcional	21
3.4 Protocolo de adaptação ao treinamento físico em piscina	22
3.5 Protocolo de treinamento físico em piscina	23
3.6 Necropsia, processamento e análise histopatológica do pulmão	23
3.7 Reação imuno-histoquímica para colágeno tipo I	24
3.8 Reação imuno-histoquímica para proteína surfactante-A (SP-A)	25
3.9 Análise qualitativa e quantitativa da fibrose pulmonar	26
3.10 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de colágeno tipo I	26
3.11 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de proteína surfactante-A e dos pneumócitos tipo II	27
3.12 Análise estatística	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Avaliação da capacidade funcional	28
4.2 Análise macroscópica e histopatológica dos pulmões	30
4.3 Análise qualitativa e quantitativa de tecido conjuntivo fibroso no pulmão ..	31
4.4 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de colágeno tipo I no pulmão	33
4.5 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de proteína surfactante-A e contagem dos pneumócitos tipo II.....	35
4.6 Correlação entre capacidade funcional e demais variáveis avaliadas	38
4.7 Correlação entre a área de tecido conjuntivo fibroso pulmonar e demais variáveis	38
4.8 Correlação entre área de colágeno tipo I ⁺ e demais variáveis	40
4.9 Correlação entre a área de SP-A ⁺ e contagem de PII	42
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	51

7 ABSTRACT	52
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
9 ANEXOS	64
9.1 Figura 3 – Pulmões de camundongos tratados ou não com bleomicina, sedentários ou submetidos à natação	64
9.2 Figura 4 – Parênquima pulmonar de camundongos tratados ou não com bleomicina, sedentários ou submetidos à natação	66
9.3 Figura 5 – Parênquima pulmonar de camundongos sedentários tratados com bleomicina	68
9.4 Figura 6 – Reação imuno-histoquímica para colágeno tipo I no parênquima pulmonar de camundongos tratados ou não com bleomicina, sedentários ou submetidos à natação	70
9.5 Figura 7 – Reação imuno-histoquímica para SP-A no parênquima pulmonar de camundongos tratados ou não com bleomicina, sedentários ou submetidos à natação	72
9.6 Documentos de aprovação no Comitê de Ética Experimental Animal da UFMG	74
9.7 Artigo submetido	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Membrana alvéolo-capilar normal formada por surfactante, pneumócitos I, membrana basal epitelial, interstício, membrana basal endotelial, e endotélio capilar	9
Figura 2 – Delineamento do estudo	20
Figura 3 (a, b, c) – Pulmões de camundongos tratados ou não com bleomicina, sedentários ou submetidos à natação	64
Figura 4 (a, b, c, d, e, f) - Parênquima pulmonar de camundongos tratados ou não com bleomicina, sedentários ou submetidos à natação	66
Figura 5 (a, b, c, d, e, f) - Parênquima pulmonar de camundongos sedentários tratados com bleomicina	68
Figura 6 (a, b, c, d, e, f) - Reação imuno-histoquímica para colágeno tipo I no parênquima pulmonar de camundongos tratados ou não com bleomicina, sedentários ou submetidos à natação	70
Figura 7 (a, b, c, d, e, f) - Reação imuno-histoquímica para SP-A no parênquima pulmonar de camundongos tratados ou não com bleomicina, sedentários ou submetidos à natação	72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comparação entre a primeira e segunda avaliações da capacidade funcional (minutos) de camundongos sedentários e submetidos à natação	28
Gráfico 2 – Comparação entre a primeira e segunda avaliações da capacidade funcional (minutos) de camundongos tratados com bleomicina, sedentários e submetidos à natação	29
Gráfico 3 – Comparação da segunda avaliação da capacidade funcional (minutos) dos camundongos sedentários e treinados do grupo controle (C-SED e C-EXE) e bleomicina (BLM-SED e BLM-EXE)	30
Gráfico 4 – Comparação da área de tecido conjuntivo fibroso pulmonar (μm^2) em camundongos sedentários e treinados do grupo controle (C-SED e C-EXE) e bleomicina (BLM-SED e BLM-EXE)	33
Gráfico 5 – Comparação da área de marcação colágeno tipo I (μm^2) no pulmão de camundongos sedentários e treinados do grupo controle (C-SED e C-EXE) e bleomicina (BLM-SED e BLM-EXE)	35
Gráfico 6 – Comparação da área de marcação de proteína surfactante A (SP-A, μm^2) de camundongos sedentários e treinados do grupo controle (C-SED e C-EXE) e bleomicina (BLM-SED e BLM-EXE)	37
Gráfico 7 – Comparação do número de pneumócitos II (PII) de camundongos sedentários e treinados do grupo controle (C-SED e C-EXE) e bleomicina (BLM-SED e BLM-EXE)	38
Gráfico 8 – Correlação entre a área de tecido conjuntivo fibrose (μm^2) e a área de marcação para colágeno tipo I (μm^2) pulmonares	39
Gráfico 9 – Correlação entre a área de tecido conjuntivo fibroso (μm^2) e de pneumócito II (PII) pulmonares	39
Gráfico 10 – Correlação entre a área de tecido conjuntivo fibroso (μm^2) e de proteína A do surfactante (SP-A) pulmonares	40
Gráfico 11 – Correlação entre a área de colágeno tipo I (μm^2) e o número de pneumócito II (PII) pulmonares	41
Gráfico 12 – Correlação entre a área de colágeno tipo I (μm^2) e de proteína A do surfactante (SP-A) pulmonares	41
Gráfico 13 - Correlação entre a área de marcação para proteína A do surfactante (SP-A) e o número de pneumócito II (PII) pulmonares	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 6MWT – Teste de Caminhada de 6 minutos (*six minute walk test*)
- BAL – Lavado Bronco-Alveolar
- CPT – Capacidade Pulmonar Total
- CRF – Capacidade Residual Funcional
- CVF – Capacidade Vital Forçada
- DIP – Doença Intersticial Pulmonar
- DL_{CO} – Difusão do Monóxido de Carbono
- DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- FGE – Fator de Crescimento Epidérmico (*epidermal growth factor*)
- FGF – Fator de crescimento fibroblástico (Fibroblast growth factor)
- FPI – Fibrose Pulmonar Idiopática
- G-CSF – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (*granulocyte-colony stimulating factor*)
- IFN-gama – Interferon-gama
- IL-1 – Interleucina-1
- IL-10 – Interleucina-10
- IL-13 – Interleucina-13
- IL-4 – Interleucina-4
- IL-6 – Interleucina-6
- IL-8 – Interleucina-8
- IL-9 – Interleucina-9
- LTh1 – Linfócito T helper-1
- LTh2 – Linfócito T helper-2
- MCP-1 – Proteína Quimiotática de Monócitos-1 (*monocyte chemotactic protein 1*)

MMP – Metaloproteínase

MMP-1 – Metaloproteínase-1

MMP-13 – Metaloproteínase-13

MMP-2 – Metaloproteínase-2 ou Gelatinase A

MMP-8 – Metaloproteínase-8

MMP-9 – Metaloproteínase-9 ou Gelatinase B

PaCO₂ – Pressão Parcial de Dióxido de Carbono no Sangue Arterial

PaO₂ – Pressão Parcial de Oxigênio no Sangue Arterial

PBS – Tampão Fosfato

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (*platelet-derived growth factor*)

PI – Pneumócito tipo I

PII – Pneumócito tipo II

SDRA – Síndrome do Desconforto Respiratória Agudo

SP-A – Proteína Surfactante A (*surfactant protein A*)

SP-D – Proteína Surfactante D (*surfactant protein D*)

TC – Tomografia Computadorizada

TGF-β – Fator de crescimento transformante-β (*transforming growth factor-β*)

TNF – Fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*)

VEF₁ – Volume Expiratório Forçado de Primeiro Segundo da Capacidade Vital

VR – Volume Residual

RESUMO

INTRODUÇÃO: Pacientes com fibrose pulmonar idiopática (FPI) apresentam baixa tolerância ao exercício funcional e qualidade de vida.

OBJECTIVOS: 1) Investigar os efeitos da bleomicina sobre a capacidade funcional em camundongos, 2) Investigar os efeitos do exercício aeróbico sobre o parênquima pulmonar de animais com fibrose pulmonar induzida por bleomicina. **MATERIAL E MÉTODOS** trinta e quatro camundongos machos Balb/c (20–25 g) receberam 6,25 U/Kg de bleomicina (BLM) via instilação intratraqueal. O grupo controle (C) recebeu salina em volume correspondente à bleomicina. Os dois grupos foram subdivididos em: sedentário (C-SED, BLM-SED) e treinado (C-EXE, BLM-EXE). Os animais foram submetidos a 2 avaliações da capacidade funcional na água (carga inicial de 2% do peso corporal), com aumento de 2% do peso a cada 3 min até a exaustão, antes e após o treinamento. Após adaptação, os animais dos grupos C-EXE e BLM-EXE foram treinados 5 vezes/semana, 1 hora/dia com 60% da carga máxima obtida na 1ª avaliação, preso na cauda, por 4 semanas. A necropsia foi feita 48 horas após a 2ª avaliação para coleta dos pulmões, fixação em formol tamponado e análise do tecido conjuntivo fibroso pelo Tricrômico de Gomori, H&E, imuno-histoquímica para SP-A e colágeno tipo I. **RESULTADOS:** Na comparação entre os grupos, considerando apenas a última avaliação da capacidade funcional, foi observado um aumento significativo do condicionamento físico dos animais dos grupos treinados C-EXE ($9,20 \pm 0,81$ min.) e BLM-EXE ($8,40 \pm 0,82$ min.) em relação aos demais grupos sedentários C-SED ($5,84 \pm 0,4$ min.) e BLM-SED ($5,67 \pm 0,60$ min.). O tecido conjuntivo fibroso, colágeno tipo I, pneumócito II, e SP-A aumentaram significativamente no grupo BLM-SED. O treinamento atenuou significativamente essa resposta. Foi observada correlação positiva forte entre tecido conjuntivo fibroso e o colágeno tipo I e, forte correlação entre o número de pneumócitos II e SP-A. O tecido conjuntivo fibroso e o colágeno tipo I apresentaram forte correlação positiva com a hiperplasia dos PII e a expressão de surfactante. **CONCLUSÃO:** O estudo mostrou pela primeira vez que o exercício físico preveniu o declínio da capacidade funcional e atenuou significativamente as lesões histopatológicas em camundongos com fibrose pulmonar induzida por bleomicina. Esses dados sugerem que o exercício físico modula a fisiopatologia e atenua a progressão da FPI, podendo constituir uma opção terapêutica não-farmacológica para essa doença.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença Intersticial Pulmonar

O interstício pulmonar é constituído pelos espaços existentes entre as células endoteliais e o epitélio alveolar, incluindo os tecidos conjuntivos, perivasculares, peribronquiolares e peribrônquicos. A doença intersticial pulmonar (DIP) é um conjunto heterogêneo de doenças caracterizadas pelo desenvolvimento de infiltrados celulares e/ou deposição de matriz extracelular no parênquima e espaços aéreos distais aos bronquíolos terminais (Martinez, 1998). Estudos demonstram que as DIP apresentam altas taxas de mortalidade e que a taxa de sobrevivência está estimada entre três a cinco anos, podendo alcançar 7 anos nos casos de transplante pulmonar bem sucedido e/ou programa de reabilitação pulmonar (Costabel *et al.*, 2001).

A denominação doença intersticial surgiu devido ao fato dos primeiros casos de doenças desse grupo terem sido observados apenas em fases avançadas de sua evolução, quando mostravam acentuada deposição de colágeno no interstício pulmonar (Martinez, 1998). As DIP abrangem uma variedade de processos patológicos, que vão desde doenças inflamatórias agudas a estágios de fibrose progressiva e irreversível (Guerra *et al.*, 2009). Fazem parte da DIP os processos inflamatórios de caráter infiltrativo, com evolução crônica ou subaguda, incluindo a toxicidade por drogas e vasculites que podem evoluir para a insuficiência respiratória grave. A DIP pode ser classificada em dois grandes grupos:

(a) Etiologia conhecida:

-Secundárias a drogas, como os agentes antineoplásicos (bleomicina, clorambucil, ciclofosfamida e metotrexato), antibióticos (nitrofurantoina e sulfasalazina), antiinflamatórios (sais de ouro e D-penicilamina), antiarrítmicos (amiodarona, propranolol e procainamida),

-Secundárias a inalação de agentes inorgânicos (sílica, asbesto, berílio, estanho e metais pesados), gases tóxicos (cloro, óxido de nitrogênio e dióxido de enxofre), agentes orgânicos causadores de pneumonites por hipersensibilidade (doença dos criadores de pássaros por inalação de antígenos de aves, pulmão do fazendeiro e pulmão dos trabalhadores com queijo) e outros tipos de agentes etiológicos (radiação, oxigênio em altas concentrações e paraquat);

(b) Etiologia desconhecida:

Fibrose pulmonar idiopática (FPI), sarcoidose, as doenças de preenchimento alveolar (proteinose alveolar e hemorragia alveolar difusa), as doenças císticas pulmonares (granuloma eosinofílico pulmonar e esclerose tuberosa) e outros processos, como as vasculites pulmonares, a pneumonia intersticial linfocítica e a hemossiderose pulmonar idiopática.

A principal queixa dos pacientes com DIP é a dispnéia, que agrava com a realização de atividades físicas e nos casos mais avançados, a dispnéia ocorre durante a realização das atividades diárias. A presença de crepitações na ausculta pulmonar pode indicar o desenvolvimento de doença fibrótica avançada (Martinez, 1998).

Uma das explicações para o desenvolvimento de fibrose pulmonar é o acúmulo de células inflamatórias ativadas nas vias aéreas inferiores, que liberam grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio, resultando em lesão do epitélio pulmonar e fibrose alveolar e/ou intersticial (Serrano-Mollar *et al.*, 2003). A

lesão epitelial é considerada o principal evento desencadeador de importantes doenças pulmonares, tais como a síndrome do desconforto respiratória agudo (SDRA), a fibrose cística e a fibrose pulmonar idiopática (FPI) (Selman & Pardo, 2001).

1.2 Fibrose Pulmonar Idiopática

A FPI é uma doença que acomete o parênquima pulmonar de forma progressiva, em resposta a algum tipo de lesão epitelial alveolar, caracterizando-se por variados graus de fibrose e espessamento dos septos alveolares, acúmulo de pneumócitos II (PII) e de miofibroblastos, bem como estreitamento de vias aéreas (Rubin *et al.*, 2000; Selman & Pardo, 2001). A FPI é um tipo distinto de DIP cuja principal característica é a deposição crônica de matriz extracelular no parênquima pulmonar, causando alteração das trocas gasosas devido a mudanças da arquitetura dos septos interalveolares (Geiser, 2003). Alguns estudos sugerem que a FPI é provocada por uma cicatrização descontrolada em resposta à agressão alveolar (Laurent *et al.*, 2008).

1.2.1 Patogênese da Fibrose Pulmonar

Ainda não está devidamente esclarecido o papel da inflamação no desencadeamento e manutenção da FPI. Na maioria das DIP, a agressão pulmonar provocada por um estímulo desconhecido produz inflamação crônica e fibrose. Contudo, ao contrário do observado em outras DIP, a biópsia pulmonar de pacientes com FPI mostra inflamação geralmente discreta em áreas de deposição de

colágeno, detectadas nos exames de imagens como alterações em “favo de mel”, bilaterais e predominantes nas áreas basais e subpleurais. Esta observação sugere que a inflamação provavelmente não é um dos principais mecanismos patogênicos da FPI (Geiser, 2003).

Após a lesão epitelial alveolar, ocorre uma re-epitelização alveolar rápida e eficiente promovida pelos PII e por células indiferenciadas que regeneram o epitélio. Contudo, os PII produzem muitas citocinas e fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento transformante- β (TGF- β), a interleucina-8 (IL-8) e a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1). A expressão aumentada de TGF- β em sua forma ativa induz a proliferação de fibroblastos com produção de colágeno tipo I (Chapman, 2004; Gharaee-Kermani *et al.*, 2007). Existem múltiplos locais de lesão epitelial alveolar que são substituídos por focos de proliferação fibroblástica e de diferenciação em miofibroblastos com deposição exuberante de matriz extracelular, destruição das unidades alvéolos-capilares e diminuição ou perda da função do órgão (Iwano *et al.*, 2002; Geiser, 2003). A contração dos filamentos citoplasmáticos de α -actina dos miofibroblastos parece ser responsável pela retração e deformação dos septos alveolares durante o desenvolvimento da fibrose (Desmoulière *et al.*, 1995; Phan, 2002).

1.2.2 Fibras colágenas, fibrose e remodelamento

O tipo de reparo a ser desenvolvido após uma agressão ao epitélio alveolar depende do nível de integridade da barreira epitelial, pois tanto a regeneração quanto a cicatrização dependem de interações complexas entre células endoteliais,

epiteliais alveolares, fibroblastos, macrófagos alveolares, fatores de coagulação, citocinas e fatores de crescimento (Goldstein, 1991).

A perda da integridade alvéolo-capilar durante a lesão pulmonar aguda estimula a atividade pró-coagulante e a deposição excessiva de fibrina que, se não removida totalmente, favorece a deposição posterior de colágeno após a migração e acúmulo de fibroblastos (Goldstein, 1991).

O processo cicatricial resulta na deposição de fibras colágenas, que são os principais constituintes da matriz extracelular. Apesar de sua grande diversidade no tecido conjuntivo, as principais são as fibras dos tipos I, II e III, que são fibrilares, e as dos tipos IV, V e VI, que são não-fibrilares ou amorfas. O colágeno I, principal proteína estrutural do interstício pulmonar, é produzido em grande quantidade durante reações fibróticas e, sua deposição como substituto ao colágeno tipo III inicialmente produzido, provoca perda da arquitetura alveolar normal e contribui para a diminuição da complacência pulmonar, a redução das trocas gasosas e demais alterações funcionais pulmonares (Entzian *et al.*, 1990).

A resposta fibroproliferativa parece ocorrer quase que imediatamente após o início da lesão, numa tentativa de reparar o dano à parede alvéolo-capilar. À medida que progride o reparo, os fibroblastos sintetizam e depositam quantidades aumentadas de matriz extracelular, que é intensificada pela liberação e ação de diversos fatores de crescimento e citocinas. Entretanto, a quantidade total de matriz celular depositada depende não só da intensidade de síntese, mas também de sua degradação (Souza *et al.*, 2003).

Muitos mediadores produzidos e liberados por diferentes células promovem a proliferação e diferenciação de fibroblastos e, a síntese de colágeno. O TGF- β é o mediador pró-fibrótico mais potente encontrado em várias doenças fibrosantes,

incluindo a FPI. Diferentes classes de bloqueadores de TGF- β , incluindo inibidores de ativação como a proteína quinase do receptor de TGF- β , têm sido testados com o objetivo de desenvolver um método terapêutico para a fibrose pulmonar em humanos (Bartram *et al.*, 2004; Laurent *et al.*, 2008).

O TGF- β é secretado em sua forma inativa para o espaço extracelular e ativado por proteases extracelulares e fatores físicos tais como a radiação ionizante. O TGF- β é quimiotático para monócitos e fibroblastos, promove a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, induz a síntese de colágeno, proteoglicanos, inibe a degradação do colágeno por inibidores de proteases e provoca redução de metaloproteinases (Toews, 2001; Pardo & Selman, 2006). Entre as isoformas existentes de TGF- β , o TGF- β_1 está envolvido na progressão da fibrose e é capaz de regular outras citocinas tais como, fator de crescimento epidérmico (FGE), fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1). Na fibrose pulmonar humana e experimental, o TGF- β é expresso em PII e em macrófagos alveolares (Broekelmann *et al.*, 1991; Laurent *et al.*, 2008), induz a diferenciação de miofibroblastos que aparecem após o término dos fenômenos inflamatórios iniciais (Masseno *et al.*, 2010), estimula a produção de matriz extracelular por células mesenquimais e inibe a degradação da matriz (Kjetil *et al.*, 2006).

A restauração da arquitetura pulmonar normal ou o desenvolvimento de fibrose progressiva dependem do equilíbrio entre as atividades anti e pró-fibróticas (Geiser, 2003). Existem dois principais mecanismos que estão envolvidos na degradação do colágeno extracelular, a fagocitose mediada pelos receptores e a degradação mediada por proteases e metaloproteinases (MMP) (Kjetil *et al.*, 2006).

As metaloproteinases são enzimas responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular e são expressas em baixos níveis pela maioria das células mesenquimais dos tecidos adultos normais. Quando ativadas, são rapidamente bloqueadas por inibidores teciduais específicos de MMP, pois o aumento de sua atividade pode destruir a arquitetura de um órgão, inclusive do pulmão. As colagenases são as metaloproteinases-1 (MMP-1), metaloproteinases-8 (MMP-8), metaloproteinases-13 (MMP-13) (Corbel *et al.*, 2000) e são responsáveis pela clivagem dos colágenos I, II e III, cujos fragmentos resultantes são mais suscetíveis à digestão pelas gelatinases (MMP-2 e MMP-9), facilitando a sua remoção do tecido (Pardo & Selman, 2006; Corbel *et al.*, 2000). A MMP-2 ou gelatinase A é distribuída no parênquima pulmonar, enquanto a MMP-9 ou gelatinase B é encontrada nos macrófagos intra-alveolares e células epiteliais alveolares (Miserocchi *et al.*, 2001). As MMP-2 e MMP-9 degradam o colágeno IV, o maior constituinte da membrana basal. Elas apresentam-se aumentadas no lavado bronco-alveolar (BAL) e nas células inflamatórias do parênquima pulmonar na fase inicial da fibrose induzida por bleomicina (pico máximo no 4º dia), sugerindo um papel importante na degradação da membrana basal e facilitando a migração de células inflamatórias (Kim *et al.*, 2009). Diferentemente da fase inicial, na fase tardia (14 a 28 dias), o PII foi a principal fonte da MMP-2, sugerindo um papel importante nessa fase, na formação de fibrose e reparo celular.

A apoptose também colabora com o processo de remodelamento através da redução do número de células do tecido de granulação intersticial e intra-alveolar e, do número excessivo de PII (Toews, 1999).

1.2.3 Proliferação de pneumócitos tipo II e produção de substância surfactante

O epitélio alveolar é constituído pelos pneumócitos I (PI), responsáveis pelas trocas gasosas e pela reabsorção do fluido alveolar e, pelos PII, capazes de secretar a substância surfactante em resposta ao estiramento da parede alveolar (Figura 1). Os PII são células cúbicas, ricas em microvilosidades, capazes de reparar a parede alveolar e compreendem cerca de 15% das células epiteliais alveolares (Sugahara *et al.*, 2006; Serrano-Mollar *et al.*, 2007). Tal capacidade proliferativa é descrita em diferentes tipos de lesões pulmonares agudas, bem como nas DIP (McElroy & Kasper, 2004). O tipo de célula que reconstitui a superfície alveolar após uma lesão depende da intensidade da destruição tecidual. Assim, quando a área lesada for pequena, ocorrerá proliferação dos PII e sua diferenciação em PI (Zhang *et al.*, 2004).

O surfactante é distribuído sobre todo o espaço aéreo alveolar como uma camada complexa de lipídios e proteínas que reduz a tensão superficial alveolar, impedindo o colapamento da parede alveolar (Rebello *et al.*, 2002). As proteínas surfactantes A e D (SP-A e SP-D) são lectinas do tipo C abundantes na substância surfactante e sua síntese ocorre nos PII e células de clara do epitélio de revestimento bronquiolar (Kuroki & Akino, 1991; Honda *et al.*, 1995; Le Vine *et al.*, 1999).

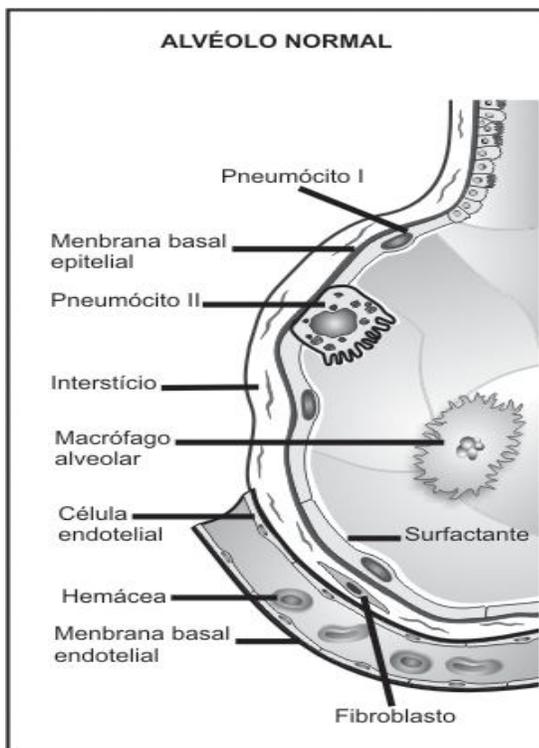


Figura 1 - Membrana alvéolo-capilar normal formada por surfactante, pneumócitos I, membrana basal epitelial, interstício, membrana basal endotelial, e endotélio capilar. Observar a presença de pneumócito II na superfície epitelial e de macrófago no interior do alvéolo (Rodrigues-Machado & Zin, 2009). Organização morfo-funcional do sistema respiratório. In Fisiologia respiratória aplicada. Rocco & Zin. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2009.

Devido à capacidade do surfactante em reduzir a tensão superficial alveolar, ocorre estabilização dos alvéolos e dos bronquíolos respiratórios durante a fase expiratória, evitando o colapso das vias aéreas distais e a perda do volume residual pulmonar. Durante a inspiração, o surfactante promove um recrutamento alveolar uniforme, reduzindo o gradiente pressórico entre o interstício e o alvéolo, diminuindo assim a formação de edema alveolar. Além disso, a SP-A apresenta propriedades imunológicas (Miyoshi, 2001) em decorrência de sua capacidade de se ligar a carboidratos e interagir com células imunes pulmonares através de opsonização. A

ausência de SP-A prejudica a eliminação tanto de bactérias como de vírus dos pulmões, podendo facilitar a disseminação sistêmica de infecções.

A expressão da SP-A do surfactante pulmonar é considerada um marcador específico de doenças pulmonares. Além de sua expressão predominante no pulmão ela pode ser expressa também no intestino delgado e no colon (Rubio *et al.*, 1995, Thomeer *et al.*, 2010).

Existem diferentes vias para avaliação da SP-A pulmonar tais como no líquido amniótico, BAL, aspirado traqueal, escarro, derrame pleural e plasma (Kuroki *et al.*, 1998). Na FPI sua concentração apresenta-se diminuída no BAL e aumentada no plasma em relação aos indivíduos saudáveis. Os mecanismos envolvidos no aparecimento da SP-A no plasma ainda não estão estabelecidos e várias hipóteses têm sido propostas; 1) aumento da permeabilidade dos vasos pulmonares, 2) destruição da barreira alvéolo-capilar e 3) diminuição das taxas do clearance na circulação. Diferente da SDRA que apresenta aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar e conseqüentemente extravasamento do surfactante, na FPI ocorre reconstrução alveolar e como resultado a membrana basal e os vasos são lesados (Kuroki *et al.*, 1998).

1.3 Alterações funcionais na Fibrose Pulmonar Idiopática

A presença de fibrose e redução da luz alveolar diminui a distensibilidade pulmonar e o desvio da curva pressão-volume para a direita que reflete a redução da complacência e o aumento do recolhimento elástico pulmonar. Adicionalmente, devido a perda de unidades funcionais e/ou diminuição da expansibilidade dos alvéolos lesados, ocorre diminuição da capacidade pulmonar total (CPT), da

capacidade vital forçada (CVF) e do volume residual (VR). Segundo Mura *et al.*, (2006), a extensão da fibrose pulmonar (% do volume pulmonar total) correlaciona-se negativamente com o volume residual (% do predito).

Devido ao aumento da força de recolhimento elástico dos pulmões e ao aumento da luz bronquiolar por retração das áreas fibróticas, os fluxos pulmonares apresentam-se aumentados em relação aos volumes pulmonares. Desse modo, a relação entre o volume expiratório forçado de primeiro segundo (VEF₁) e a CVF apresenta-se normal ou elevada. Essa alteração da função pulmonar é denominada de disfunção ventilatória tipo restritiva (Thomeer *et al.*, 2010).

As alterações de troca gasosa são as mais precoces, principalmente devido ao distúrbio da relação ventilação/perfusão. A redução da pressão parcial de oxigênio no sangue arterial (PaO₂) é progressiva e mais acentuada no exercício. Devido ao aumento da ventilação alveolar imposto pelo aumento da frequência respiratória, a pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial (PaCO₂) geralmente apresenta-se reduzida.

A medida de difusão, avaliada pela difusão do monóxido de carbono (DL_{CO}), é considerado um marcador precoce da doença. Essa alteração é secundária à redução da área de secção transversa e espessamento da membrana alvéolo-capilar (Thomeer *et al.*, 2010). Mura *et al.*, (2006), demonstraram que a dispnéia correlacionou inversamente com DL_{CO} em % com o predito.

A capacidade de exercício em pacientes com FPI é limitada pela troca gasosa e comprometimento ventilatório e o teste de caminhada de 6 minutos (6MWT, six minute walk test) (Cahalin *et al.*, 1996) tem sido utilizado para avaliar a 1) capacidade de exercício, 2) as alterações funcionais resultantes da progressão da doença ou 3) intervenções terapêuticas. Esse teste foi validado recentemente para

pacientes com FPI e a distância da caminhada correlaciona-se diretamente com o VEF₁ (Mura *et al.*, 2006).

1.4 Bleomicina e Doença Intersticial Pulmonar

Vários modelos animais têm sido estabelecidos para estudar a fisiopatologia da FPI. A maioria desses modelos envolve a administração de drogas, compostos químicos, irradiação ou infecção. A administração da bleomicina em roedores, através de diferentes vias, está entre os primeiros e mais difundidos métodos, baseado no fato de que a fibrose pulmonar é um dos maiores de seus efeitos colaterais quando utilizada para terapia de câncer humano (Moeller *et al.*, 2008). A bleomicina induz lesão epitelial e inflamação alveolar, iniciada por uma super-expressão de radicais livres, seguida por um processo fibroproliferativo, fibrose e depleção simultânea de antioxidantes.

O sulfato de bleomicina é um agente quimioterápico derivado de antibióticos glicopeptídicos citotóxicos hidrossolúveis e isolados do *Streptomyces verticillus*. A administração de bleomicina pode produzir fibrose pulmonar, pneumonia de hipersensibilidade e nódulos pulmonares. Embora os mecanismos de ação antineoplásico da bleomicina não sejam totalmente conhecidos, evidências indicam que a bleomicina inibe a síntese de DNA (*Deoxyribonucleic acid*) e bloqueia parcialmente a síntese de RNA (*Ribonucleic acid*) e de proteínas. Possui uma potente atividade antitumoral de uso freqüente em linfomas, tumores germinativos e carcinomas de células escamosas (Serrano-Mollar *et al.*, 2002).

A bleomicina causa pneumonite em 46% dos pacientes submetidos a quimioterapia, dentre esses, 3% chegam ao óbito. Essa pneumonite pode evoluir

gradualmente durante o tratamento ou desenvolver meses após a sua conclusão. O efeito da bleomicina no pulmão é dose-dependente e estima-se que em pacientes que foram submetidos à administração de uma dose maior que 300 mg, a incidência de pneumonia intersticial é de 3 a 5%, a dose maior que 500 mg a incidência é de 20% (Benitez, 2006).

A idade avançada, a dose, o uso de O₂ suplementar, radioterapia, insuficiência renal e uso concomitante de fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF, *granulocyte-colony stimulating factor*) são fatores que contribuem para uma maior toxicidade. Os achados histológicos nos pulmões são inespecíficos, porém, em fases avançadas, observa-se pneumonite intersticial fibrosante semelhante à FPI. O padrão radiológico de aspecto nodular das DIP pode ser confundido com metástases pulmonares. O diagnóstico de comprometimento pulmonar por drogas quimioterápicas também pode ser confundido com lesões pulmonares produzidas pela radioterapia e por infecções oportunistas (Rubin *et al.*, 2000).

Os efeitos colaterais pulmonares são dose-dependentes e estão relacionadas com a idade, a ocorrência de doenças pulmonares pré-existentes e o tabagismo. A toxicidade pulmonar induzida por bleomicina está clinicamente associada com o desenvolvimento de tosse, dispnéia, febre, cianose e diminuição dos parâmetros da função pulmonar (Moeller *et al.*, 2008).

Estudos experimentais mostraram que número aumentado de linfócitos é encontrado no lavado bronco-alveolar, no parênquima pulmonar e no tecido linfático peribronquial de camundongos tratados com bleomicina e que o grau da reação fibrótica crônica pode relacionar-se à intensidade da resposta inflamatória aguda (Martinez, 1998). Uma característica importante do modelo de fibrose pulmonar

induzida por bleomicina é a liberação, por fagócitos ativados, de grande quantidade de espécies reativas de oxigênio após a administração da droga (Gao *et al.*, 2008).

A apresentação clínica mais frequente consiste em um início subagudo, com dispnéia, tosse seca e dor torácica, entre o segundo e sexto mês de tratamento. No exame físico identificam-se crepitações à ausculta pulmonar, febre e taquipnéia. No radiograma de tórax, pode ser observado infiltrado reticular ou micronodular bilateral na maioria dos casos, podendo evoluir, em casos graves, para áreas de faveolamento. Na tomografia computadorizada (TC) de tórax, é possível diagnosticar mais precocemente esta toxicidade, através de imagens nodulares e opacidades justapleurais. O padrão funcional característico da toxicidade por bleomicina é o de um distúrbio ventilatório restritivo, com redução na difusão de monóxido de carbono. Mesmo em pacientes sem sintomas ou alterações radiológicas, o emprego da bleomicina determina redução na CVF em cerca de 50% dos casos. Em casos graves, pode ser observado hipoxemia com aumento do gradiente alvéolo-arterial de oxigênio (Rubin *et al.*, 2000). A tolerância ao exercício funcional e qualidade de vida também são afetados em pacientes com FPI, sendo um bom candidato para iniciar em um programa de reabilitação pulmonar (Spruit *et al.*, 2009).

1.5 Reabilitação Pulmonar

A reabilitação pulmonar é um programa multidisciplinar de cuidados para o paciente com doença respiratória crônica, com os objetivos de reduzir os sintomas, estabilizar ou reverter as manifestações sistêmicas da doença, otimizar o status funcional e social e a autonomia. As bases científicas dos componentes individuais da reabilitação pulmonar foram recentemente delineadas pela *American College of*

Chest Physicians (ACCP) and American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation (AACVPR, 2002).

Tipicamente, os programas de reabilitação incluem a avaliação do paciente, treinamento de exercício, educação, intervenção nutricional, e suporte psico-social. Tradicionalmente, o programa de reabilitação pulmonar direciona-se para pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e seus efeitos sobre outras doenças pulmonares crônicas tem sido muito pouco estudados.

Recentemente, a reabilitação pulmonar para pacientes com fibrose pulmonar tem recebido considerável atenção. Similarmente aos pacientes com DPOC, os pacientes com FPI apresentam redução na tolerância ao exercício e na qualidade de vida (Spruit *et al.*, 2009). A dispnéia é um dos sintomas mais prevalentes na limitação da capacidade de exercício em pacientes com FPI. Contudo, 35% dos pacientes relatam a fadiga dos membros inferiores como a principal razão para interromper o teste de exercício cardiopulmonar quando realizado em cicloergômetro. Adicionalmente foi observado também, redução da força do músculo quadríceps (65% do valor normal) que foi relacionada com baixa capacidade aeróbica de pico.

Estudos sobre a reabilitação pulmonar em pacientes com FPI são escassos e a maioria dos autores utiliza o regime de treinamento adotado nos programas de reabilitação respiratória e/ou cardíaca. Jastrzêbski *et al.* (2006) avaliaram o nível de dispnéia e a qualidade de vida em pacientes com doença pulmonar intersticial (21 deles com FPI) após 6 semanas de reabilitação. Neste estudo, os pacientes foram submetidos a exercícios isométricos, correccionais, de musculatura respiratória (executado em Threshold IMP, Healthdyne Technologies - UK), de tórax e treinamento em bicicleta ergométrica, todos executados durante 12 semanas. Esses

autores observaram que a reabilitação causou redução da sensação de dispnéia e melhorou a qualidade de vida, sem, entretanto alterar a função pulmonar. O programa de reabilitação incluiu treinamento dos músculos respiratórios e dos membros inferiores no cicloergômetro. Resultados semelhantes foram observados por Holland *et al.* (2008). Esses autores randomizaram 57 pacientes com DPI (34 FPI) em três grupos: 1) programa supervisionado de reabilitação pulmonar por 8 semanas (2x por semana), 2) programa domiciliar não supervisionado (5x por semana) e 3) grupo controle com suporte semanal por telefone, porém sem prescrição de exercício. O treinamento foi realizado em esteira e cicloergômetro por 30 minutos associado ao treinamento de *endurance* de membros superiores e de força de membros inferiores. A reabilitação melhorou a capacidade de exercício e os sintomas. Entretanto, esses benefícios não foram sustentados seis meses após a intervenção. De acordo com os dados, o treinamento físico para esse grupo de paciente é seguro e melhora a capacidade funcional, dispnéia e qualidade de vida. Entretanto, os efeitos do exercício em longo prazo não estão estabelecidos (Spruit *et al.*, 2009).

Estudos em fisiologia do exercício têm utilizado animais de laboratório para simular as condições de estresse físico observadas em humanos e sua finalidade é o melhor acompanhamento das alterações sistêmicas, celulares e moleculares decorrentes da atividade física (Papoti *et al.*, 2003). O exercício aeróbico realizado de forma crônica é responsável por modificações no sistema cardiorespiratório tanto em repouso como durante o exercício, principalmente quando o treinamento aeróbico é realizado em intensidade baixa a moderada (Medeiros *et al.*, 2000).

No caso de corrida em esteira para ratos e camundongos, a intensidade do esforço é elevada através do aumento da velocidade e/ou inclinação da esteira, o

que possibilita a determinação da intensidade através do limiar anaeróbico em exercício incremental em esteira. Em protocolos de natação para roedores, o exercício incremental é obtido acrescentando-se cargas progressivamente mais pesadas em relação ao peso corporal, colocadas no tórax ou na cauda do animal. O uso da natação como modelo de exercício para camundongos evita a seleção dos animais, pois os mesmos precisam nadar para evitar a submersão na água. A medida do tempo que o animal consegue nadar, com diferentes cargas, permite calcular a sua capacidade funcional, que inclui o seu desempenho funcional (Gobatto *et al.*, 2001).

1.6 Justificativa

Diante das dúvidas sobre a patogênese das DIP e da escassez de estudos humanos e experimentais sobre a prática de atividade física como método de condicionamento físico deste grupo de doenças pulmonares, resolvemos verificar a influência do exercício aeróbico sobre a capacidade funcional e as lesões pulmonares em camundongos com fibrose pulmonar induzida por bleomicina.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

2.1.1 Avaliar os efeitos do tratamento com bleomicina sobre o desempenho físico em camundongos, antes e após o treinamento de exercício aeróbico em piscina.

2.1.2 Avaliar os efeitos do exercício aeróbico sobre as lesões pulmonares produzidas por bleomicina.

2.2 Específicos

Em camundongos submetidos à administração de bleomicina e/ou natação:

2.2.1 Avaliar a sobrecarga máxima e o tempo de exercício até a exaustão;

2.2.2 Realizar análise macroscópica e histopatológica pulmonar;

2.2.3 Quantificar as áreas de fibrose pulmonar através de histoquímica;

2.2.4 Avaliar qualitativa e quantitativamente a expressão de colágeno tipo I no parênquima pulmonar através de reação imuno-histoquímica;

2.2.5 Avaliar qualitativa e quantitativamente a expressão de proteína surfactante-A, bem como quantificar os pneumócitos tipo II no parênquima pulmonar através de reação imuno-histoquímica;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados trinta e quatro camundongos BALB/c machos com dez semanas de idade, provenientes do Biotério Central do ICB - UFMG, divididos aleatoriamente em grupo controle (C, n=14) e grupo experimental com indução de fibrose pulmonar por bleomicina (BLM, n=20). Posteriormente os grupos C e BLM foram sub-divididos em grupos sedentários (C-SED, n=6 e BLM-SED, n=8) e treinados (C-EXE, n=6 e BLM-EXE, n=8), (Figura 2).

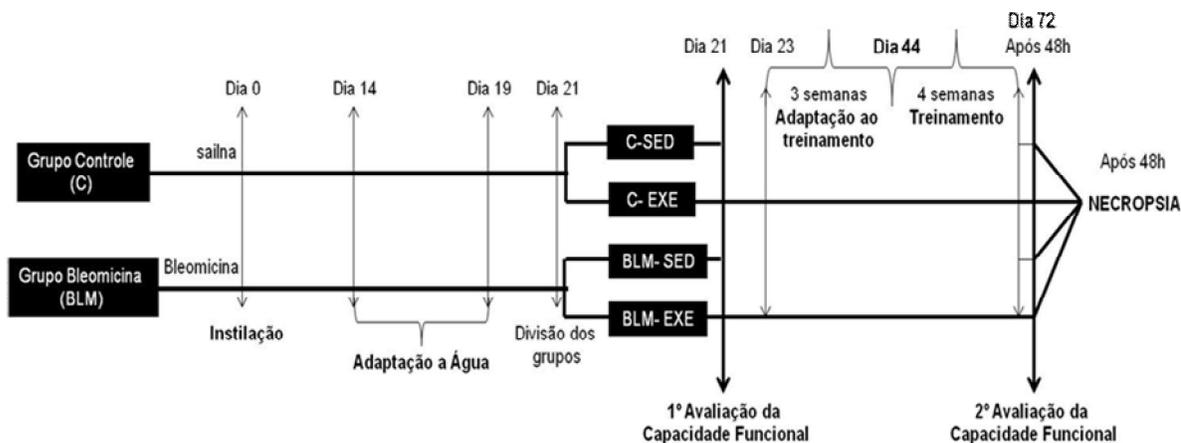


Figura 2 – **Delineamento do estudo.** C-SED: Grupo controle-sedentário (n=6); C-EXE: Grupo controle-exercício (n=6); BLM-SED: Grupo bleomicina-sedentário (n=8); BLM-EXE: Grupo bleomicina-exercício (n=8).

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com temperatura ambiente em torno de 23°C, exposição à luz por doze horas, recebendo água e ração Purina para roedores *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA – UFMG), protocolo 262/2008.

3.2 Indução de fibrose pulmonar

Os animais do grupo BLM (n=20) foram anestesiados intraperitonealmente com solução de Cetamina 5% (200 mg/Kg) e xilazina 2% (10 mg/Kg) diluídos em 2 mL de solução de NaCl a 0,9% (salina). Após a anestesia, foi realizada a instilação intratraqueal de uma única dose de 6,25 U/Kg de Bleomicina (BLM – Sulfato de Bleomicina, Meizle Biopharma) diluída em solução salina (Russo *et al.*, 2009). Os animais do grupo controle (C, n=14) receberam somente solução salina em volume correspondente a solução de bleomicina diluída.

Após vinte e um dias da instilação intratraqueal de BLM ou salina, os grupos foram subdivididos em C-SED (n=6), C-EXE (n=6), BLM-SED (n=8) e BLM-EXE (n=8). Todos os animais foram submetidos à avaliação da capacidade funcional através de um teste incremental em piscina após a subdivisão dos grupos e no final do estudo.

3.3 Avaliação da capacidade funcional

A natação foi realizada em uma piscina de vidro contendo as seguintes dimensões: 100 cm de comprimento, 45 cm de profundidade, 40 cm de largura, dividida em oito raias de 20X25 cm cada, com aquecimento elétrico e controle de temperatura que foi mantida em $31\pm 1^{\circ}\text{C}$. A profundidade utilizada para os

procedimentos na piscina foi de 40 cm, a temperatura foi controlada por um termostato e homogeneizada por sistema de circulação da água por toda a piscina.

Todos os animais foram adaptados à água da piscina por três minutos, a vinte centímetros de profundidade, durante cinco dias, uma vez ao dia, após quatorze dias da instilação intratraqueal e sem sobrecarga (Afonso *et al.*, 2003).

Na avaliação da capacidade funcional os animais foram colocados individualmente na piscina, com uma sobrecarga de 2% do peso corporal preso à cauda e para natação durante três minutos. A cada três minutos foram acrescentados mais 2% do peso corporal, sem interrupção do exercício, até o momento de exaustão. A exaustão foi caracterizada pela imersão de cinco a sete segundos sem que o animal retornasse a superfície. Em seguida, o camundongo foi retirado da piscina e colocado sobre o dorso da mão do examinador, em posição supina. Foi considerado como sinal de exaustão, a permanência do animal nessa posição sem reação de endireitamento do corpo. A carga final do teste (carga máxima) foi utilizada como referência para a adaptação e treinamento dos animais. Após cada teste, os animais foram secados e colocados novamente em gaiola comunitária. Para análise final do estudo, foram consideradas a primeira, a segunda e última avaliação funcional. Toda a padronização da avaliação da capacidade funcional foi baseada no estudo desenvolvido por Almeida *et al.* (2009).

3.4 Protocolo de adaptação ao treinamento físico em piscina

Os animais dos grupos C-EXE e BLM-EXE foram submetidos à adaptação ao exercício em piscina, que consistiu de natação com sobrecarga de 60% da carga máxima obtida na primeira avaliação da capacidade funcional. Essa carga foi

calculada como descrito anteriormente no item 3.3. Os animais dos grupos BLM-EXE e C-EXE nadaram durante dez, vinte e quarenta minutos/dia durante cinco dias/semana, respectivamente na primeira, segunda e terceira semanas (Gobatto *et al.*, 2001).

3.5 Protocolo de treinamento físico em piscina

Os animais dos grupos C-EXE e BLM-EXE foram treinados em piscina por sessenta minutos diários, cinco dias por semana e durante quatro semanas, com uma sobrecarga presa à cauda equivalente a 60% da carga máxima obtida na primeira avaliação da capacidade funcional. Quarenta e oito horas após a última sessão, os animais foram novamente submetidos à avaliação da capacidade funcional (Gobatto *et al.*, 2001).

3.6 Necropsia, processamento e análise histopatológica do pulmão

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com 200 mg/Kg de cetamina 5% e 10 mg/Kg de xilazina 2%, diluídos em 2 mL de solução salina fisiológica, quarenta e oito horas após a última avaliação da capacidade funcional, para a retirada dos órgãos. Após a anestesia, a traquéia foi exposta e canulada e, foi feita a laparotomia, afastamento dos órgãos para a secção da artéria aorta abdominal e veia cava inferior. Em seguida, a traquéia foi completamente ocluída por fio de sutura para manter os pulmões em capacidade residual funcional (CRF). Foi realizada a incisão no músculo diafragma e, em seguida, a toracotomia esternal para a retirada do pulmão em CRF juntamente com o coração. Esses foram lavados

com solução de NaCl 0,9%, examinados macroscopicamente e fixados em formol tamponado à 10%. Fragmentos do pulmão foram desidratados, diafanizados, parafinados e incluídos em parafina. Cortes de aproximadamente 4µm de espessura foram obtidos e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) e Tricrômico de Gomori para análise histopatológica e análise quantitativa da fibrose. Outros cortes dos mesmos fragmentos foram utilizados para a realização de reação imuno-histoquímica anti-colágeno tipo I e anti-proteína surfactante A (SP-A).

3.7 Reação imuno-histoquímica para colágeno tipo I

À partir dos mesmos fragmentos pulmonares coletados, foram obtidos outros cortes para processamento à imuno-histoquímica. Os cortes foram desparafinados, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes e lavados em tampão fosfato (PBS) pH 7,2. A atividade da peroxidase endógena foi eliminada incubando os cortes em solução de H₂O₂ 30vv a 3,5% em 200 mL de PBS por vinte minutos e os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados incubando os cortes com soro de coelho diluído 1:40 por trinta minutos. Os cortes foram incubados com soro monoclonal anti-colágeno tipo I (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) diluído 1:50, por 16 a 18 horas; lavados em PBS; incubados com IgG biotinilada de coelho anti-IgG de cabra (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, USA) e estreptavidina conjugada com peroxidase (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA), diluída 1:50, ambos por 1 hora cada. A marcação foi detectada usando solução de diaminobenzidina 0,05% em H₂O₂ 40vv à 0,2%. Como controle negativo, o antisoro 1º foi substituído por PBS em alguns cortes. Como controles positivos foram utilizados cortes histológicos de pulmão normal de camundongos. Os cortes

foram contracorados com Hematoxilina de Harris diluída em água destilada a 60% e montados em entelan.

3.8 Reação imuno-histoquímica para proteína surfactante- A (SP-A)

À partir dos mesmos fragmentos pulmonares coletados, foram obtidos outros cortes para identificação imuno-histoquímica de SP-A. Os cortes também foram desparafinados, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes e lavados em tampão fosfato (PBS) pH 7,2. Foi realizado o reaproveitamento antigênico com a solução Dako Retrieval (Dako, USA) à 100°C por vinte minutos. A atividade da peroxidase endógena foi eliminada incubando os cortes em solução de H₂O₂ 30vv a 3,5% em 200 ml de PBS por vinte minutos e os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados incubando os cortes com soro de cabra diluído 1:40 por trinta minutos. Os cortes foram incubados com soro monoclonal anti-SP-A (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) diluído 1:50, por 16 a 18 horas; em seguida, foram lavados em PBS; incubados com IgG biotinizada de cabra anti-IgG de coelho diluído 1:50 (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, USA) e estreptavidina conjugada com peroxidase diluída 1:50 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA), ambos por 1 hora cada. A marcação foi detectada usando solução de diaminobenzidina 0,05% em H₂O₂ 40vv à 0,2%. Como controles positivos foram utilizados cortes de pulmão de camundongos considerados saudáveis. Como controle negativo, o anti-soro 1° foi substituído por PBS em alguns cortes. Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris diluída a 60% em água destilada e montados em entelan.

3.9 Análise qualitativa e quantitativa da fibrose pulmonar

Todos os cortes histológicos corados pelo Tricrômico de Gomori foram visualizados pela objetiva de 40X para digitalização de trinta imagens aleatórias através da microcâmara JVC TK-1270/RGB (Tokyo, Japan), perfazendo uma área total de 533.334 μm^2 de parênquima pulmonar analisado em cada caso. A área de fibrose foi calculada através da seleção dos pixels com tons de verde na imagem real, com subsequente criação de uma imagem binária e processamento digital. Todas as medidas foram obtidas pelo software KS300 do analisador de imagens Carl Zeiss (Oberkochen, Germany). A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e a definição das condições de morfometria é a descrita por Caliarì (1997).

3.10 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de colágeno tipo I

Todos os cortes histológicos submetidos à reação imuno-histoquímica anti-colágeno tipo I foram visualizados pela objetiva de 40X para digitalização de trinta imagens aleatórias através da mesma microcâmara. A área positiva de colágeno tipo I foi calculada através da seleção dos pixels com tons de marrom e da execução das etapas de medida no mesmo programa de morfometria.

3.11 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de proteína surfactante-A e dos pneumócitos tipo II

Foi feita a descrição qualitativa de todas as reações imuno-histoquímicas anti-SP-A e também a mensuração da área SP-A positiva e dos PII em 30 imagens aleatórias do parênquima pulmonar, utilizando a mesma câmera e o mesmo programa, através da seleção dos pixels das áreas marcadas. Nas mesmas imagens digitalizadas, foi realizada contagem manual dos PII através de ferramentas do programa KS300.

3.12 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). Distribuição Gausiana foi testada utilizando-se o teste Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram analisados por *one way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni e teste t de Student pareado e não pareado quando apropriado. As correlações foram realizadas pelo teste de correlação de Pearson. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. A análise dos dados foi realizada pelo software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da capacidade funcional

O teste com sobrecargas progressivas foi utilizado para comparar a capacidade funcional máxima de cada animal entre os diferentes grupos. Quando comparadas as capacidades funcionais dos animais dos grupos C-SED e C-EXE da primeira e da segunda avaliação, foi observada uma diminuição do condicionamento físico dos animais sedentários, 1ª C-SED ($7,79 \pm 0,53$ min.) e 2ª C-SED ($5,84 \pm 0,4$ min.), e um aumento da capacidade funcional dos animais treinados, 1ª C-EXE ($7,19 \pm 1,1$ min.) e 2ª C-EXE ($9,20 \pm 0,81$ min.) ($p < 0,05$) (Gráfico 1).

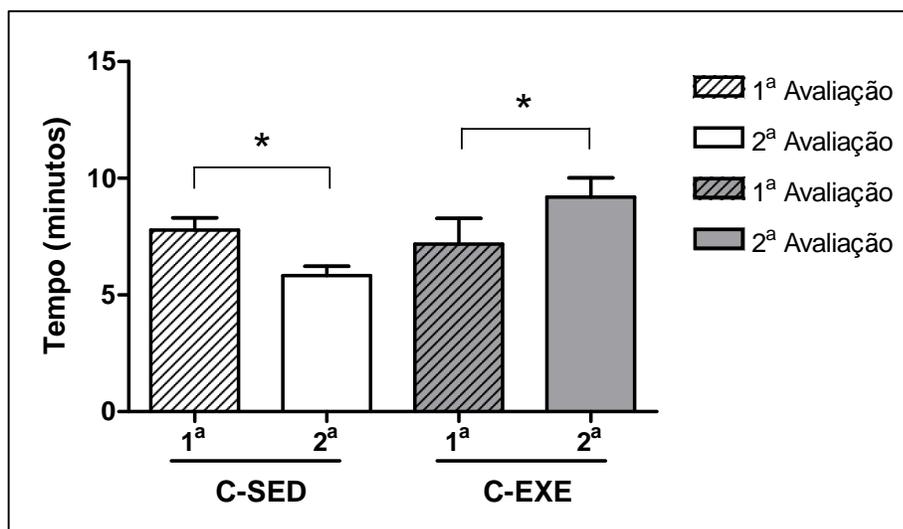


GRÁFICO 1 – Comparação entre a primeira e segunda avaliações da capacidade funcional (minutos) de camundongos sedentários e submetidos à natação. C-SED: Grupo controle-sedentário; C-EXE: Grupo controle-exercício. * $p < 0,05$ em relação à primeira avaliação.

Nos animais do grupo BLM-SED foi verificada uma redução significativa do condicionamento físico quando foi comparada a 1ª avaliação do grupo BLM-SED ($7,65 \pm 0,57$ min.) com a 2ª avaliação do mesmo grupo ($5,67 \pm 0,60$ min.) ($p < 0,05$) (Gráfico 2).

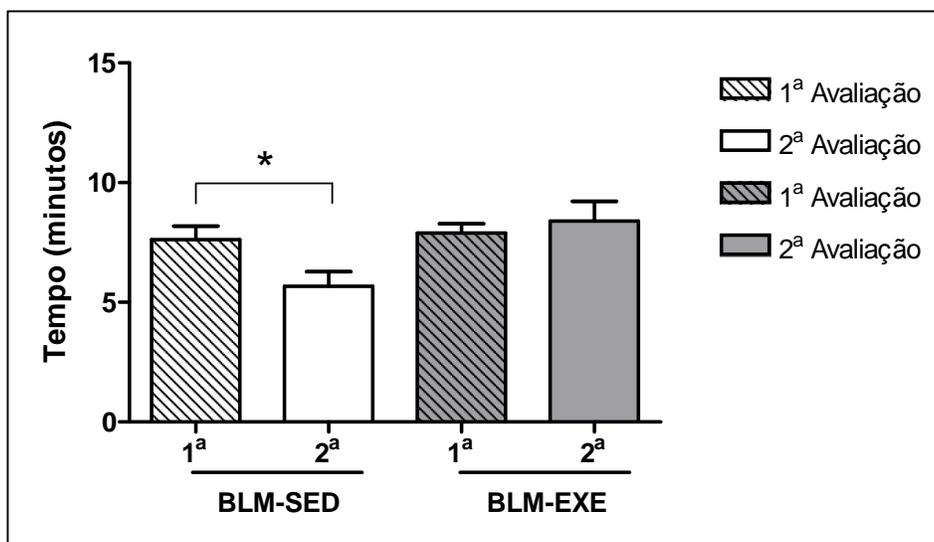


GRÁFICO 2 – Comparação entre a primeira e segunda avaliações da capacidade funcional (minutos) de camundongos tratados com bleomicina, sedentários e submetidos à natação. BLM-SED: Grupo bleomicina-sedentário; BLM-EXE: Grupo bleomicina-exercício. * $p < 0,05$ em relação a primeira avaliação.

À comparação entre os grupos, considerando apenas a última avaliação da capacidade funcional, foi observado um aumento significativo do condicionamento físico dos animais dos grupos treinados C-EXE ($9,20 \pm 0,81$ min.) e BLM-EXE ($8,40 \pm 0,82$ min.) em relação aos demais grupos sedentários C-SED ($5,84 \pm 0,4$ min.) e BLM-SED ($5,67 \pm 0,60$ min.), ($p < 0,05$) (Gráfico 3).

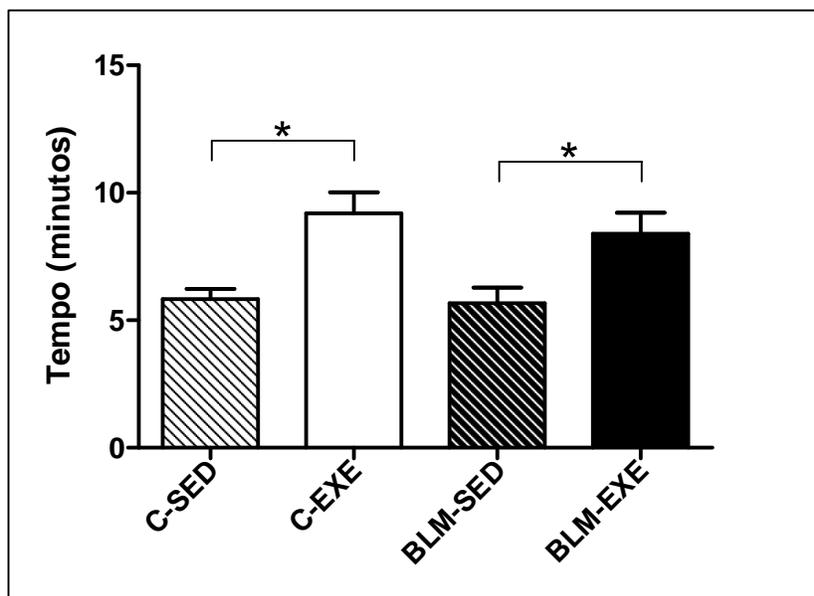


GRÁFICO 3 – Comparação da segunda avaliação da capacidade funcional (minutos) dos camundongos sedentários e treinados do grupo controle (C-SED e C-EXE) e bleomicina (BLM-SED e BLM-EXE). * $p < 0,05$ em relação aos grupos sedentários.

4.2 Análise macroscópica e histopatológica dos pulmões

Os pulmões dos animais dos grupos C-SED e C-EXE (dado não mostrado) mostraram aspectos macroscópicos normais (Figura 3a). Diferentemente, no grupo BLM-SED, a superfície pleural dos pulmões de todos os animais apresentou algumas regiões compactas, de consistência firme e de coloração branco-avermelhada sugestivas de fibrose (Figura 3b). Tais regiões compactas branco-avermelhadas não foram observadas nos animais do grupo BLM-EXE, excetuando 01 animal no qual foram encontradas pequenas zonas hemorrágicas e de maior consistência (Figura 3c).

No parênquima pulmonar dos animais dos grupos C-SED e C-EXE foi observado aspecto histológico normal, com bronquíolos e alvéolos aerados e, septos interlobulares e alveolares de espessura normal (Figuras 4a, b). Nos animais sedentários que receberam bleomicina foi observada inflamação fibrosante peribronquiolar, perivascular e nos septos interalveolares, com infiltrado predominantemente mononuclear discreto ou moderado, caracterizando um quadro de pneumonite intersticial fibrosante (Figuras 4c, d). Focos de aglomerados de células com aspecto morfológico de PII, macrófagos e fibroblastos associados à fibrose também foram observados (Figura 4d). O acúmulo destas células produziu espessamento dos septos alveolares e, menos frequentemente, dos septos interlobulares (Figura 5b). O epitélio bronquiolar mostrava algumas regiões com necrose, com ou sem macrófagos de citoplasma espumoso em contato com o epitélio e, pequenas papilas epiteliais projetadas para o lúmen bronquiolar, resultantes de hiperplasia regenerativa (Figuras 5c, d). Também foram observados aglomerados de macrófagos espumosos no lúmen alveolar e pequenas regiões com alvéolos colapsados, demonstrando a presença de atelectasia (Figuras 5a, e, f). No grupo BLM-EXE o parênquima pulmonar mostrou redução visível de todas as alterações descritas observadas nos animais do grupo BLM-SED (Figuras 4e, f).

4.3 Análise qualitativa e quantitativa de tecido conjuntivo fibroso no pulmão

O parênquima pulmonar dos animais dos grupos C-SED e C-EXE (dado não mostrado) apresentou septos alveolares com delgadas fibras colágenas junto a escassos fibroblastos, capilares e outras células conjuntivais (Figura 4b). Tecido conjuntivo fibroso em proporção e disposição normais foi também observado nos

espaços intersticiais peribronquiolares, perivasculares, interlobulares e subpleurais. No grupo BLM-SED, os animais apresentaram alterações da arquitetura do parênquima pulmonar caracterizadas por fibrose focal e/ou difusa de intensidade variável, principalmente nos septos alveolares e interstícios peribronquiolares e perivasculares, associadas ou não com aglomerados de células epiteliais alveolares, fibroblastos e macrófagos (Figuras 4c, d). O espessamento fibrocelular dos septos alveolares resultou em diminuição dos espaços aéreos, principalmente dos alveolares e, em menor grau, dos bronquiolares. A deposição de fibras colágenas foi encontrada com menor frequência nos espaços interlobulares e subpleurais. No grupo BLM-EXE foi observada redução visível da fibrose em todas as regiões e o restabelecimento de grande parte do espaço aéreo alveolar, quando comparado com o grupo BLM-SED (Figuras 4e, f).

Nos animais dos grupos C-SED e C-EXE foram encontradas respectivamente, $179,83 \pm 51,27 \mu\text{m}^2$ e $262,29 \pm 54,81 \mu\text{m}^2$ de tecido conjuntivo fibroso. Já no grupo BLM-SED ($4.647,61 \pm 939,69 \mu\text{m}^2$; $p < 0,05$), a área mensurada foi significativamente superior à dos grupos controles. O treinamento físico em piscina a que foram submetidos os animais do grupo BLM-EXE ($649,88 \pm 98,35 \mu\text{m}^2$; $p < 0,05$), promoveu redução significativa da área de fibrose quando comparada com o grupo BLM-SED ($4.647,61 \pm 939,69 \mu\text{m}^2$). Entretanto, o grupo BLM-EXE apresentou maior área de tecido conjuntivo fibroso quando comparado com os grupos C-SED e C-EXE ($179,83 \pm 51,27 \mu\text{m}^2$ e $262,29 \pm 54,81 \mu\text{m}^2$, respectivamente; $p < 0,05$). Os resultados foram expressos como média da área em 30 imagens analisadas \pm erro padrão (Gráfico 4).

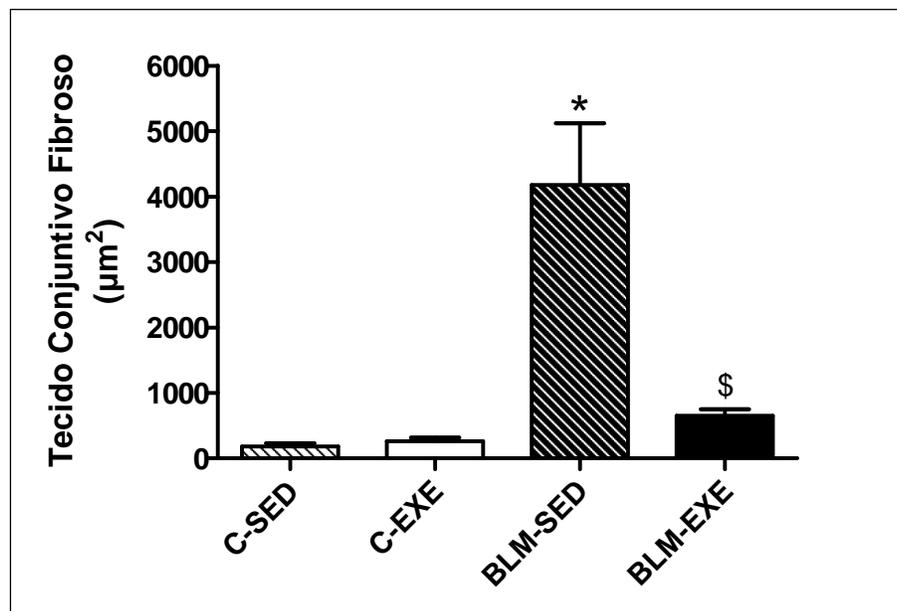


GRÁFICO 4 – Comparação da área de tecido conjuntivo fibroso pulmonar (μm^2) em camundongos sedentários e treinados do grupo controle (C-SED e C-EXE) e bleomicina (BLM-SED e BLM-EXE). * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos e § $p < 0,05$ em relação aos grupos C-SED e C-EXE.

4.4 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de colágeno tipo I no pulmão

Nos cortes histológicos onde o anticorpo 1º foi substituído por PBS não foi observada reação positiva no interstício pulmonar, bem como em outras regiões (Figura 6a). Nos grupos C-SED e C-EXE (dado não mostrado), foram observadas delgadas zonas de marcação positiva para colágeno tipo I, caracterizadas pela presença de precipitados corados em tons de marrom nos espaços intersticiais alveolares, peribronquiolares, perivasculares, interlobulares e subpleurais (Figura 6b). Diferentemente, o grupo BLM-SED, o interstício apresentava espessas áreas de marcação positiva para colágeno I, especialmente nos septos alveolares e

interstícios peribronquiolares e perivasculares, associadas ou não com aglomerados de células epiteliais alveolares, fibroblastos e macrófagos (Figuras 6c, d). Em menor grau, foi observada marcação positiva também em espaços interlobulares e subpleurais (Figura 6c). Assim como verificado através da coloração pelo Tricrômico de Gomori, os animais do grupo BLM-EXE apresentaram redução visível da fibrose em todos os espaços intersticiais, em relação ao grupo BLM-SED (Figuras 6e, f).

Os resultados para área de colágeno I foram semelhantes à área de tecido fibroso pulmonar. O grupo BLM-SED ($2.814,24 \pm 505,73 \mu\text{m}^2$) foi significativamente superior aos grupos C-SED ($143,65 \pm 40,75 \mu\text{m}^2$) e C-EXE ($130,65 \pm 20,79 \mu\text{m}^2$) e BLM-EXE ($427,20 \pm 66,12 \mu\text{m}^2$). O treinamento físico atenuou a área de tecido fibroso pulmonar (BLM-EXE), essa alteração permaneceu aumentada em relação aos grupos C-SED e C-EXE. Os resultados foram expressos como média da área em 30 imagens analisadas \pm erro padrão (Gráfico 5).

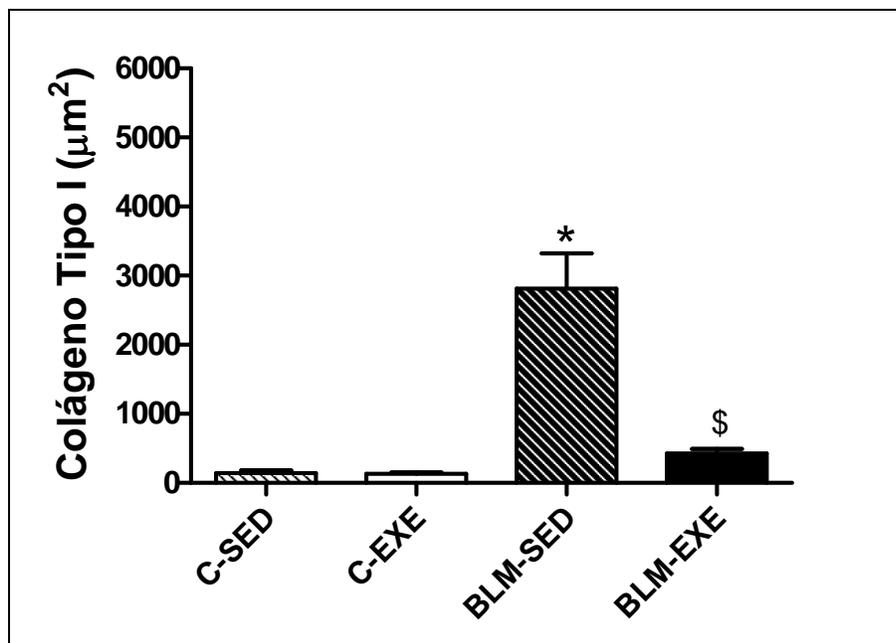


GRÁFICO 5 – Comparação da área de marcação de colágeno tipo I (μm^2) no pulmão de camundongos sedentários e treinados do grupo controle (C-SED e C-EXE) e bleomicina (BLM-SED e BLM-EXE). * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos e $^{\$}p < 0,05$ em relação aos grupos C-SED e C-EXE.

4.5 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de proteína surfactante-A e contagem dos pneumócitos tipo II

Nos cortes histológicos onde o anticorpo anti-SP-A foi substituído por PBS, não foi observada a presença de precipitados marrons no parênquima pulmonar, que seria indicativo de reação positiva (Figura 7a). Nos animais dos grupos C-SED e C-EXE (dado não mostrado) foram observadas marcações SP-A⁺ nas paredes alveolares e no citoplasma de PII, bem como nas células de clara e nas superfícies epiteliais dos bronquíolos (Figura 7b). No grupo BLM-SED foram observadas marcações bem evidentes nos espaços intersticiais interalveolares, peribronquiolares, perivasculares, interlobulares e subpleurais. Grande quantidade

de PII positivos para SP-A foi frequentemente encontrada como aglomerados celulares em todas as regiões acima mencionadas (Figuras 7c, d). Em comparação com o grupo BLM-SED, os animais do grupo BLM-EXE apresentaram marcação SP-A⁺ em menor quantidade nas mesmas regiões do parênquima pulmonar e, menor frequência de aglomerados de PII SP-A⁺ (Figuras 7e, f).

A área positiva para SP-A dos grupos C-SED ($245,01 \pm 61,35 \mu\text{m}^2$) e C-EXE ($197,35 \pm 19,82 \mu\text{m}^2$) não diferiram entre si. Diferentemente, o grupo BLM-SED ($2.304,21 \pm 546,51 \mu\text{m}^2$; $p < 0,05$) apresentou área SP-A⁺ significativamente superior à dos grupos controles e BLM-EXE ($1.066,32 \pm 155,82 \mu\text{m}^2$). O treinamento físico em piscina promoveu redução significativa da área positiva para SP-A, mas foi superior aos grupos C-SED e C-EXE. Os resultados foram expressos como média da área em 30 imagens analisadas \pm erro padrão (Gráfico 6).

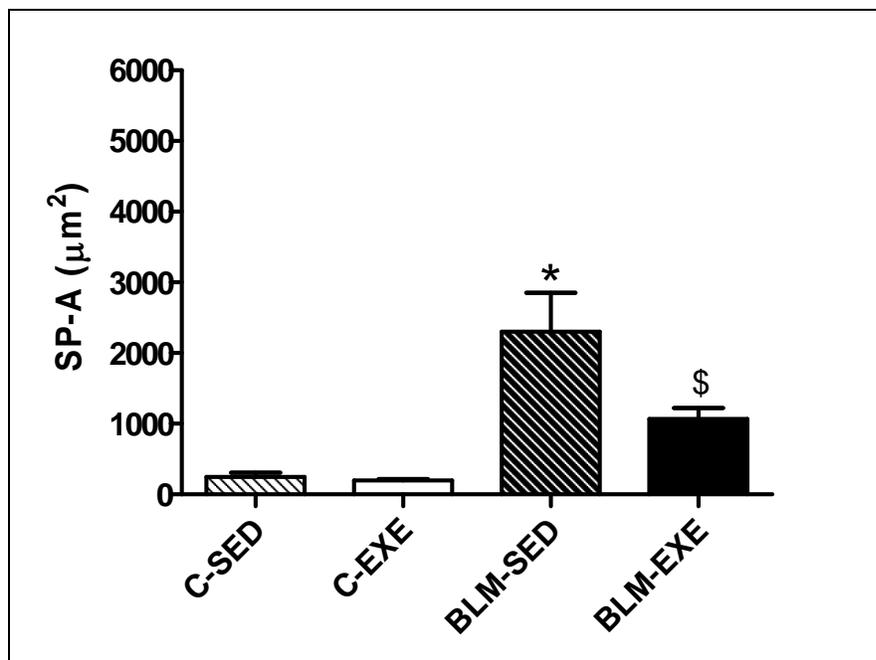


GRÁFICO 6 – Comparação da área de marcação de proteína surfactante A (SP-A, μm^2) de camundongos sedentários e treinados do grupo controle (C-SED e C-EXE) e bleomicina (BLM-SED e BLM-EXE). * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos e § $p < 0,05$ em relação aos grupos C-SED e C-EXE.

O número de células PII com marcação positiva para SP-A no grupo C-EXE ($12,39 \pm 0,59$; $p < 0,05$) foi maior quando comparado com o grupo C-SED ($7,76 \pm 0,50$). No grupo BLM-SED ($59,41 \pm 5,26$; $p < 0,05$), o número de PII foi significativamente superior à dos grupos controles. O treinamento físico em piscina a que foram submetidos os animais do grupo BLM-EXE ($40,02 \pm 3,17$) promoveu redução significativa do número de PII com marcação positiva para SP-A quando comparada com o grupo BLM-SED ($p < 0,05$). Entretanto, o grupo BLM-EXE apresentou maior número de PII marcados por SP-A que os grupos C-SED e C-EXE ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como média da área em 30 imagens analisadas \pm erro padrão (Gráfico 7).

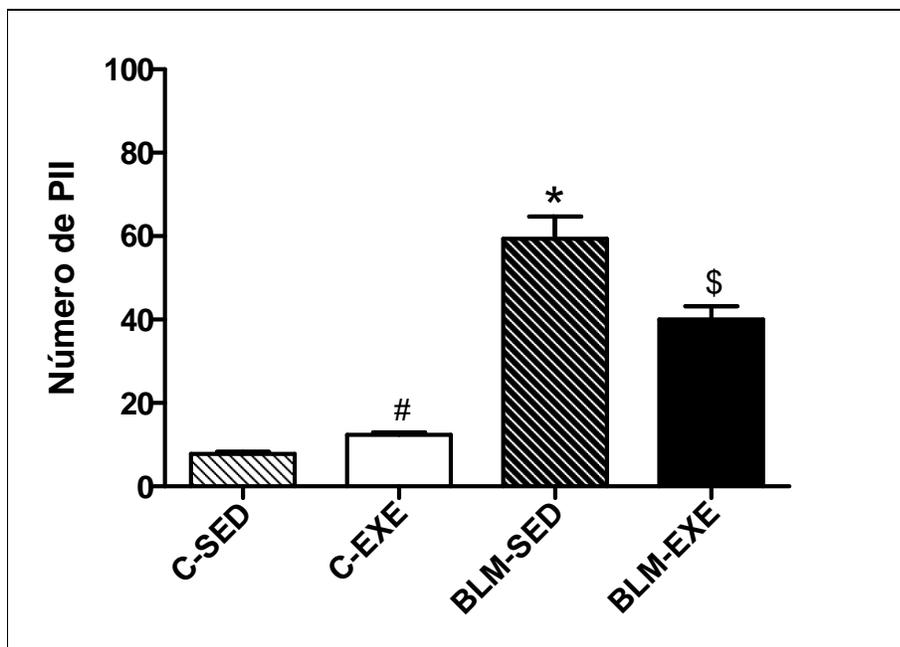


GRÁFICO 7 – Comparação do número de pneumócitos II (PII) de camundongos sedentários e treinados do grupo controle (C-SED e C-EXE) e bleomicina (BLM-SED e BLM-EXE). * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. $^{\$}p < 0,05$ em relação aos grupos C-SED e C-EXE. $^{\#}p < 0,05$ em relação ao grupo C-SED.

4.6 Correlação entre capacidade funcional e demais variáveis avaliadas

A avaliação da capacidade funcional não obteve correlação com nenhum dos parâmetros avaliados.

4.7 Correlação entre a área de tecido conjuntivo fibroso pulmonar e demais variáveis

Como esperado, o tecido conjuntivo fibroso correlacionou de forma positiva e fortemente com o colágeno I ($r=0,9709$ e $p < 0,0001$, Gráfico 8) e de forma forte e

positiva com o número de PII ($r=0,7225$ e $p<0,0001$, Gráfico 9) e a área de marcação para SP-A ($r=0,7738$ e $p<0,0001$, Gráfico 10).

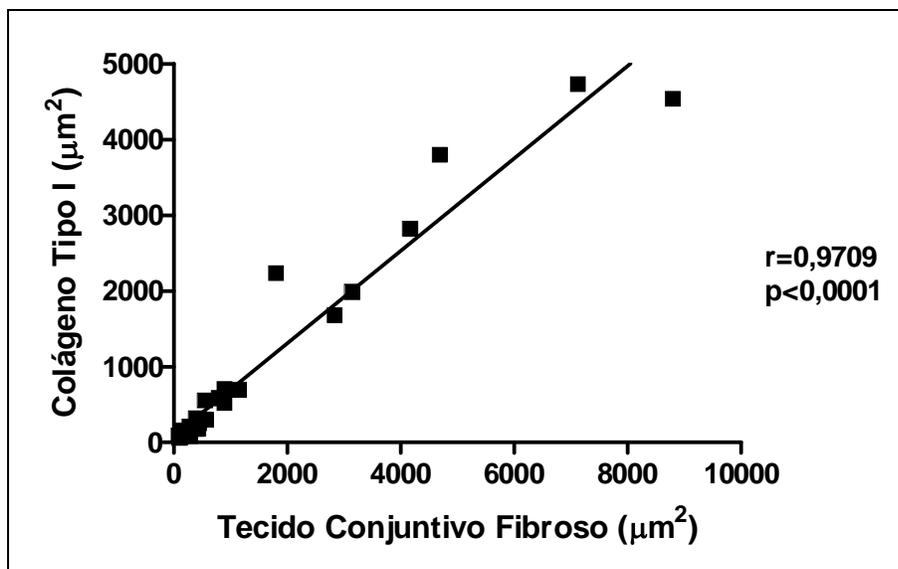


GRÁFICO 8 – Correlação entre a área de tecido conjuntivo fibrose (μm^2) e a área de marcação para colágeno tipo I (μm^2) pulmonares.

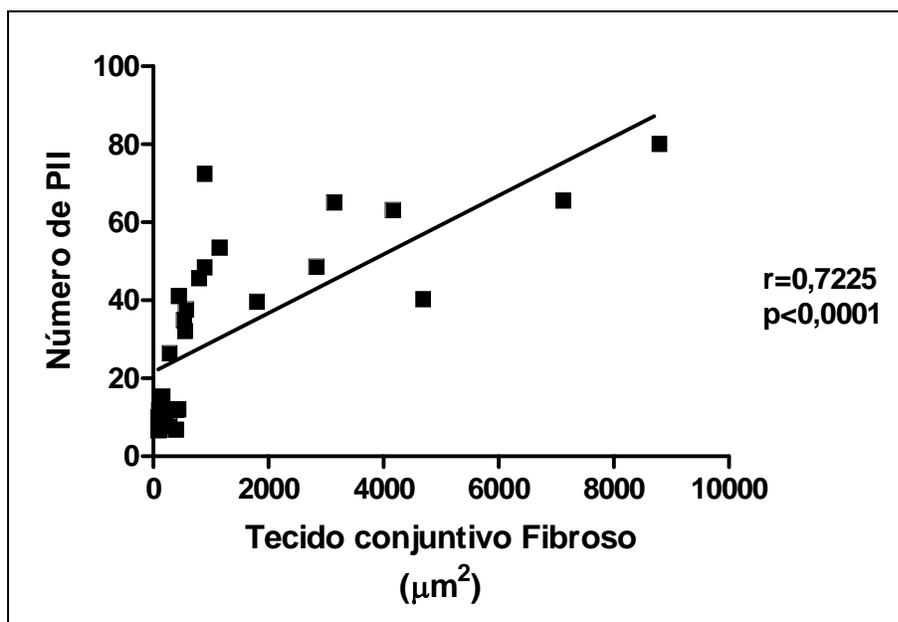


GRÁFICO 9 – Correlação entre a área de tecido conjuntivo fibrose (μm^2) e de pneumócito II (PII) pulmonares.

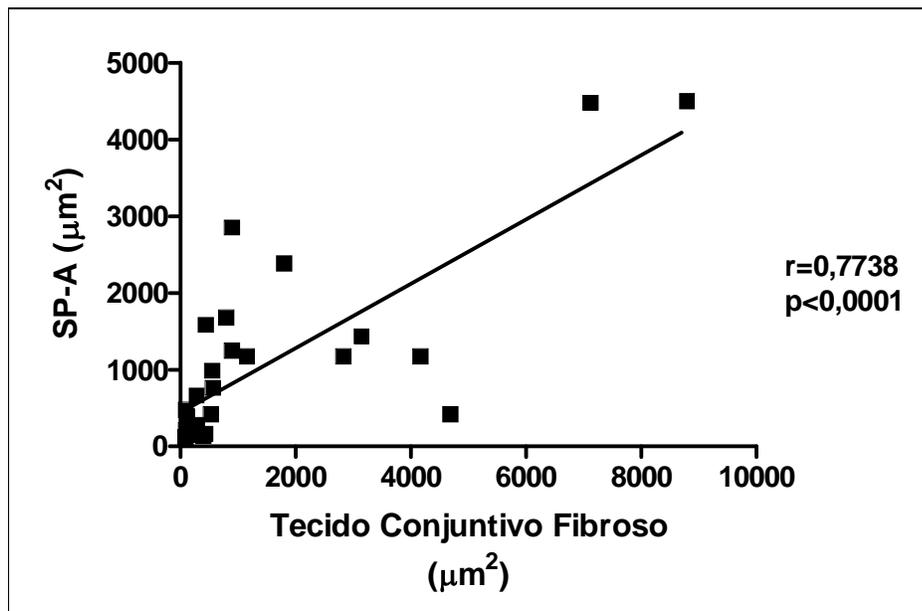


GRÁFICO 10 – Correlação entre a área de tecido conjuntivo fibroso (μm^2) e de proteína A do surfactante (SP-A) pulmonares.

4.8 Correlação entre área de colágeno tipo I e demais variáveis

Similarmente ao tecido conjuntivo fibroso, foi observada forte correlação positiva da área de colágeno tipo I com o número de PII ($r=0,7069$ e $p<0,0001$, Gráfico 11) e com a área de SP-A ($r=0,7462$ e $p<0,0001$, Gráfico 12).

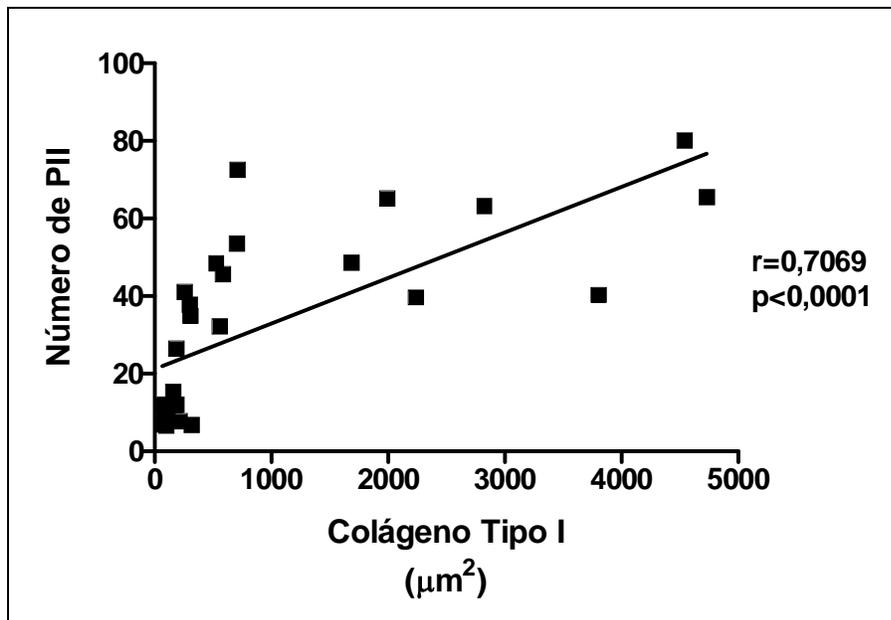


GRÁFICO 11 – Correlação entre a área de colágeno tipo I (μm^2) e o número de pneumócito II (PII) pulmonares.

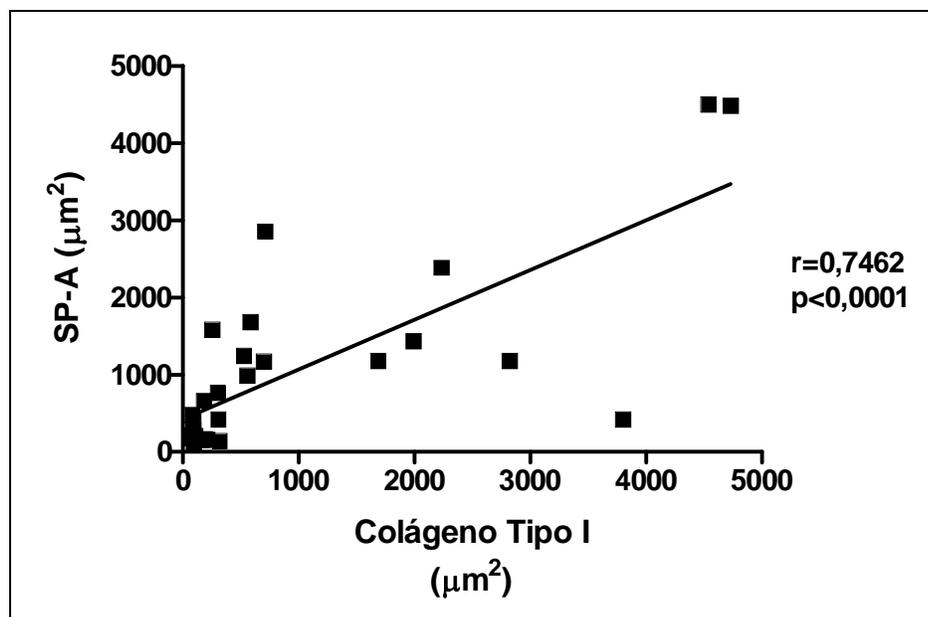


GRÁFICO 12 – Correlação entre a área de colágeno tipo I (μm^2) e de proteína A do surfactante (SP-A) pulmonares.

4.9 Correlação entre a área de SP-A e contagem de PII

Correlação forte e positiva entre a área de SP-A e o número de PII, ($r=0,8167$; $p<0,0001$) (Gráfico 13).

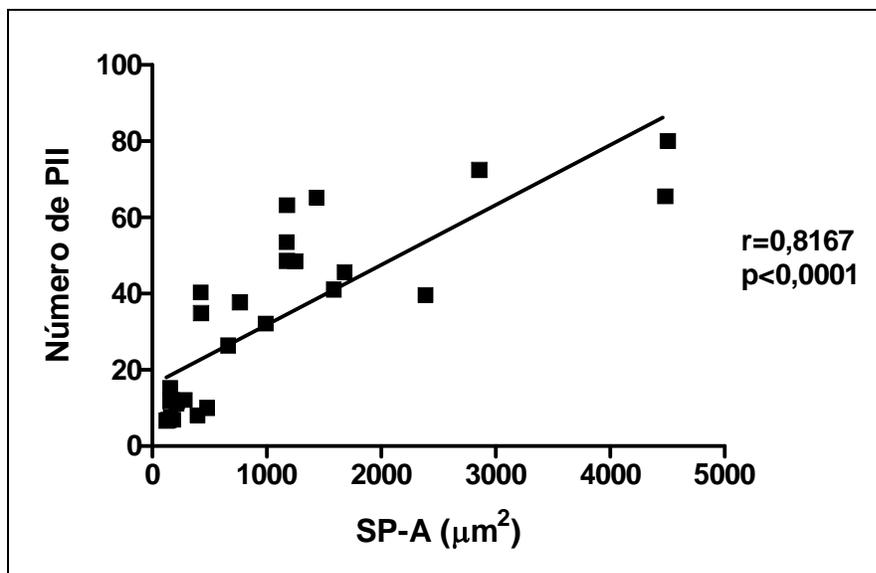


GRÁFICO 13 - Correlação entre a área de marcação para proteína A do surfactante (SP-A) e o número de pneumócito II (PII) pulmonares.

5 DISCUSSÃO

Este estudo mostrou, pela primeira vez, que o exercício aeróbio atenuou significativamente o tecido fibroso, o colágeno tipo I, a hiperplasia do PII e a produção/liberação de SP-A alveolar, em animais com fibrose pulmonar induzida por bleomicina. Além disso, observou-se que o exercício aeróbico impediu o declínio funcional em camundongos tratados com bleomicina em comparação com os grupos sedentários.

De acordo com a nova classificação da ATS / ERS (2002), a FPI é um tipo distintivo de pneumonia intersticial fibrosante crônica de causa desconhecida com o teste de função pulmonar anormal demonstrando padrão restritivo do distúrbio e/ou troca de gases prejudicada, diminuição da PaO_2 no repouso ou exercício, ou diminuição da capacidade de difusão pulmonar do CO (DL_{CO}). A dispnéia é o sintoma mais importante e incapacitante.

Neste estudo, foi utilizado o modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, considerado o melhor modelo murino caracterizado atualmente (Moore & Hogaboam, 2007). A sua utilização em modelos animais de fibrose pulmonar é baseado no fato de que a fibrose é um dos principais efeitos adversos da bleomicina no tratamento do câncer humano (Moeller *et al.*, 2008).

A fibrose pulmonar em humanos induzida por bleomicina é caracterizada por lesões de células epiteliais alveolares, hiperplasia de pneumócitos tipo II, o acúmulo de fibroblastos e miofibroblastos, e a deposição de proteínas da matriz extracelular, resultando em perda progressiva da arquitetura pulmonar normal e comprometimento na troca gasosa (Moore & Hogaboam, 2007).

Existem diferentes vias de administração de bleomicina e, como na maioria dos estudos, foi utilizada uma única instilação intratraqueal de bleomicina ajustada ao peso. A presença de fibrose pulmonar induzida por bleomicina foi confirmada macroscopicamente e microscopicamente.

Com o objetivo de avaliar o efeito do exercício sobre a capacidade funcional em animais com fibrose pulmonar induzida por bleomicina, os animais foram submetidos a um programa de adaptação e posteriormente treinamento em piscina. O treinamento teve duração de 4 semanas com sobrecarga de 60% da carga máxima obtida na primeira avaliação da capacidade funcional. O protocolo de adaptação ao exercício iniciou-se no 23º dia após a instilação da bleomicina, ou seja, na fase crônica, caracterizada por remodelamento da matriz extracelular e deposição de colágeno (Gao *et al.*, 2008). Na comparação entre os grupos ao final do treinamento, considerando apenas a última avaliação da capacidade funcional, foi observado um aumento significativo do condicionamento físico dos animais dos grupos treinados C-EXE e BLM-EXE em relação aos demais grupos sedentários C-SED e BLM-SED, sugerindo que o exercício aeróbico em piscina preveniu o declínio da capacidade funcional dos animais tratados com bleomicina. Na comparação entre a 1ª e 2ª avaliação foi observado que o grupo controle aumentou significativamente a capacidade funcional após o exercício. Esse resultado não foi observado no grupo tratado com bleomicina evidenciando a complexidade de resposta ao treinamento físico. Nesse estudo foi observado que o exercício atenuou várias alterações pulmonares induzidas pela bleomicina. Entretanto, não foi observada correlação entre essas alterações (aumento de tecido conjuntivo fibroso e colágeno, hiperplasia de PII e presença de SP-A) e a capacidade funcional dos animais submetidos ao

exercício. Esse resultado pode estar relacionado ao comprometimento sistêmico de doenças pulmonares crônicas.

Além das alterações do sistema respiratório, pacientes com doença crônica como a fibrose pulmonar apresentam também morbidades secundárias tais como disfunção dos músculos periféricos (descondicionamento, miopatias por esteróides, desnutrição, redução da massa corporal, fadiga, efeitos da hipoxemia, distúrbio ácido-básico e anormalidades eletrolíticas) e dos músculos respiratórios, anormalidades nutricionais (caquexia, redução da massa corporal), comprometimento cardíaco (descondicionamento e *cor pulmonale*) e déficits psicossociais que podem comprometer a capacidade funcional. Uma possível explicação para esses resultados é que a redução da tolerância ao exercício na FPI é multifatorial, podendo envolver a deficiência na troca gasosa e o comprometimento ventilatório, o aumento do espaço morto pulmonar, disfunção da musculatura periférica e respiratória e a redução da complacência pulmonar. Além destas alterações, as anormalidades cardiovasculares e nutricionais também podem estar envolvidos (Mura *et al.*, 2006).

Tem sido demonstrado que, além de 28 dias, a resposta à bleomicina é variável. A instilação intratraqueal de bleomicina pode induzir fibrose, que evolui ou persiste por 60-90 dias ou pode resolver após esse período. Como o exercício foi aplicado 23 dias após a administração da bleomicina, foi considerado como um tratamento antifibrótico ao invés de tratamento anti-inflamatório que é realizado durante a fase inicial da doença (Moore & Hogaboam, 2007).

À análise macroscópica dos pulmões foram observadas alterações características de fibrose nos animais sedentários tratados com bleomicina, tais como: regiões compactas, de consistência firme e de coloração branco-avermelhada

sugestivas de fibrose na superfície pleural. Essas alterações não foram observadas nos animais treinados, tratados por bleomicina.

No parênquima pulmonar dos animais sedentários que receberam bleomicina foi observado um quadro de pneumonite intersticial fibrosante semelhante ao observado no homem (American Thoracic Society/European Respiratory Society International, 2002; International Consensus Statement, 2000).

Já é bem descrito que múltiplos locais de lesão epitelial alveolar são substituídos por focos de proliferação fibroblástica e de diferenciação em miofibroblastos com deposição exuberante de matriz extracelular, destruição das unidades alvéolos-capilares e diminuição ou perda da função do órgão (Iwano *et al.*, 2002; Geiser, 2003).

Focos de aglomerados de células com aspecto morfológico de PII, macrófagos e fibroblastos associados à fibrose também foram notados, produzindo espessamento dos septos alveolares e, menos frequentemente, dos septos interlobulares. O epitélio bronquiolar apresentou algumas regiões com necrose, com ou sem macrófagos de citoplasma espumoso em contato com o epitélio e, pequenas papilas epiteliais projetadas para o lúmen bronquiolar, resultantes de hiperplasia regenerativa. Também foram observados aglomerados de macrófagos espumosos no lúmen alveolar e pequenas regiões com alvéolos colapsados, demonstrando a presença de atelectasia. No grupo BLM-EXE o parênquima pulmonar mostrou redução visível de todas as alterações descritas no grupo BLM-SED.

A análise do tecido conjuntivo fibroso do grupo BLM-SED demonstrou alterações da arquitetura do parênquima pulmonar caracterizadas por fibrose focal e/ou difusa de intensidade variável, resultando em diminuição dos espaços aéreos, principalmente dos alveolares e, em menor grau, dos bronquiolares. No grupo BLM-

EXE foi observada redução visível da fibrose em todas as regiões e o restabelecimento de grande parte do espaço aéreo alveolar, quando comparado com o grupo BLM-SED.

Resultados semelhantes foram observados na análise qualitativa e quantitativa do colágeno tipo I, principal constituinte do tecido conjuntivo. Nos animais do grupo BLM-SED foram observadas áreas espessas de marcação positiva para colágeno I, especialmente nos septos alveolares e interstícios peribronquiolares e perivasculares, associadas ou não com aglomerados de células epiteliais alveolares, fibroblastos e macrófagos. Assim como verificado através da coloração pelo Tricrômico de Gomori, os animais do grupo BLM-EXE apresentaram redução visível da fibrose em todos os espaços intersticiais, em relação ao grupo BLM-SED. O colágeno tipo I, maior constituinte da matriz extracelular correlacionou fortemente com área de tecido conjuntivo fibroso ($r=0,9709$; $p<0,0001$). O colágeno I é produzido em grande quantidade durante reações fibróticas e sua deposição provoca perda da arquitetura alveolar normal e contribui para a diminuição da complacência pulmonar, a redução das trocas gasosas e demais alterações funcionais pulmonares (Entzian *et al.*, 1990). Baseado neste raciocínio é provável que a elevada fibrose observada nos animais do grupo BLM-SED tenha colaborado com o declínio de sua capacidade funcional. Em contrapartida e assim como verificado através da coloração pelo Tricrômico de Gomori, os animais do grupo BLM-EXE apresentaram redução visível da quantidade de colágeno tipo I em todos os espaços intersticiais, em relação ao grupo BLM-SED.

Ainda não são totalmente compreendidos os efeitos e mecanismos do exercício aeróbico sobre diferentes condições patológicas pulmonares bem como sobre o sistema imunológico. É sugerido que o exercício aeróbico de baixa e

moderada intensidade é capaz de exercer um efeito protetor contra a inflamação alérgica pulmonar e o remodelamento das vias aéreas na asma experimentalmente induzida em camundongos (Vieira *et al.*, 2007).

Apesar do exercício físico intenso no homem ser acompanhado de aumento nas concentrações plasmáticas das citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL-1 β e interleucina-6 (IL-6), tais aumentos não são capazes de provocar alterações sistêmicas graves (Ostrowski *et al.*, 1999). Segundo os autores, a regulação por outros mecanismos, como a elevação concomitante da citocina reguladora interleucina-10 (IL-10), são capazes de restringir a ação das citocinas pró-inflamatórias. Durante o desenvolvimento da fibrose pulmonar idiopática parece ocorrer um desequilíbrio entre as respostas Th2 e Th1 que favorece a deposição de matriz extracelular. Nos pulmões de pacientes com FPI foi observado aumento de IL-4, IL-9, IL-13, citocinas pró-fibróticas, em contrapartida de uma redução do IFN- γ , inibidor da fibrogênese (Wallace *et al.*, 1995). O TGF- β é outra citocina importante na patogênese da FPI, pois é quimiotático para monócitos e fibroblastos, promove a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, induz a síntese de colágeno, proteoglicanos, inibe a degradação do colágeno por inibidores de proteases e provoca redução de metaloproteinases (Toews, 2001; Pardo & Selman, 2006), contudo é desconhecido o efeito do exercício sobre a sua expressão. O estudo da expressão de diferentes citocinas em nosso modelo experimental poderá colaborar para uma maior compreensão das alterações intersticiais observadas nos animais tratados com bleomicina e submetidos a exercício aeróbico.

Além disso, alguns autores observaram redução significativa da dispnéia e melhora da qualidade de vida em pacientes portadores de fibrose pulmonar

idiopática, submetidos a exercícios para os músculos respiratórios e treinamento físico em bicicleta ergométrica (Jastrzêbski *et al.*, 2006).

O epitélio, particularmente o PII, apresenta um papel crítico na iniciação e perpetuação da fibrose pulmonar frente aos diferentes insultos, endógenos ou exógenos (Hardie *et al.*, 2009). O número de PII aumentou drasticamente no grupo BLM-SED. O exercício modulou diferentemente nos grupos C-EXE e BLM-EXE. No grupo C-EXE foi observado aumento e no grupo BLM-EXE foi observado redução do número de PII. Esses resultados sugerem um dual papel do exercício, com discreto aumento em condições fisiológicas e redução importante da hiperplasia em condições patológicas. O PII correlacionou de forma forte e positiva com o colágeno tipo I ($r=0,7069$ e $p<0,0001$) e área de tecido conjuntivo fibroso ($r=0,7225$ e $p<0,0001$).

A expressão da SP-A do surfactante pulmonar é considerada um marcador específico de doenças pulmonares. Na FPI sua concentração apresenta-se diminuída no BAL e aumentada no plasma em relação aos indivíduos saudáveis. Os mecanismos envolvidos no aparecimento da SP-A no plasma ainda não estão estabelecidos. Provavelmente é devido a uma combinação da perda da integridade da barreira epitelial e causada por lesão pulmonar e hiperplasia de PII (Greene *et al.*, 2002).

Esse estudo mostrou pela primeira vez que na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina ocorreu um aumento expressivo da SP-A no parênquima pulmonar e que o exercício atenuou essa resposta. Os níveis séricos de SP-A podem ser de grande importância na evolução dos pacientes com FPI. Takahashi *et al.* (2006) descobriram que pacientes com menores níveis séricos de SP-A tinham um melhor prognóstico que aqueles que apresentavam níveis elevados.

Em condições normais a expressão de SP-A ocorre nas paredes alveolares e no citoplasma de PII, bem como nas células de clara e nas superfícies epiteliais dos bronquíolos. No grupo BLM-SED foram observadas marcações bem evidentes nos espaços intersticiais interalveolares, peribronquiolares, perivasculares, interlobulares e subpleurais. Elhalwagi *et al.* (1999) avaliaram os efeitos da superexpressão de SP-A sobre a homeostasia pulmonar e a função do surfactante em animais transgênicos. Esses autores observaram que a tolerância ao exercício agudo e a complacência pulmonar não alteraram em animais que superexpressam SP-A. O exercício físico agudo, com duração de uma hora em esteira, também não foi capaz de aumentar os níveis séricos da SP-A em voluntários saudáveis (Nanson *et al.*, 2001). A SP-A correlacionou positivamente de forma forte com o pneumócito II ($r=0,8167$ e $p<0,0001$). Similarmente ao pneumócito II, nesse estudo foi observado também correlação forte e positiva com o colágeno I ($r=0,7069$ e $p<0,0001$) e tecido conjuntivo fibroso ($r=0,7225$ e $p<0,0001$).

6 CONCLUSÃO

Esse estudo mostrou pela primeira vez que o exercício físico preveniu o declínio da capacidade funcional e atenuou significativamente as lesões histopatológicas em camundongos com fibrose pulmonar induzida por bleomicina. Esses dados sugerem que o exercício físico modula a fisiopatologia e atenua a progressão da FPI podendo constituir uma opção terapêutica não-farmacológica para essa doença.

7 ABSTRACT

INTRODUCTION: Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients present poor functional exercise tolerance and quality of life.

OBJECTIVE: 1) To Investigate the bleomycin effects on exercise capacity in mice, 2) To Investigate the effects of aerobic exercise on lung parenchyma .

MATERIAL AND METHODS: Thirty four male Balb / c mice (20-25 g) received 6.25 U / kg bleomycin (BLM) via intratracheal instillation, the control group (C) received saline volume corresponding to bleomycin. The two groups were subdivided into: sedentary (C-SED, BLM-SED) and trained (C-EXE, BLM-EXE). The animals underwent two assessments of functional capacity in water (initial charge of 2% of body weight), an increase of 2% of body weight every 3 min until exhaustion before and after training. After adjustment, the animals in groups C-EXE and BLM-EXE were trained five days a week 1 hora/dia with 60% of maximum load obtained in a second evaluation, stuck in the tail, for 4 weeks. The autopsy was performed 48 h after the 2nd assessment for collection of the lungs, fixed in buffered formalin and analyzed by Gomori's trichrome, H & E, immunohistochemistry of SP-A, connective tissue and collagen type I. **RESULTS:** In comparison between groups, considering only the latest assessment of functional capacity, we observed a significant increase in physical condition of animals in groups trained C-EXE (9.20 ± 0.81 min.) and BLM-EXE ($8, 40 \pm 0.82$ min.) related to other sedentary groups C-SED (5.84 ± 0.4 min.) and BLM-SED (5.67 ± 0.60 min.). The connective tissue, collagen type I, II pneumocytes, and SP-A increased significantly in group BLM-SED. The training significantly attenuated this response. We observed strong positive correlation between tissue and collagen and a strong correlation between the number of pneumocytes and SP-A. The connective tissue and collagen type I showed a strong positive correlation with the hyperplasia of PII and production / release of surfactant. **CONCLUSION:** In conclusion, this study showed for the first time that physical exercise prevented the decline of functional capacity and significantly attenuated the histopathological lesions in mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. These data suggest that exercise modulates the pathophysiology and attenuates the progression of IPF and may constitute a non-pharmacological treatment option for this disease

Key words: Exercise training, idiopathic pulmonary fibrosis, surfactant protein A (SP-A), type I collagen.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, M., SOUZA, C. N., ZAGATTO, A. M., LUCIANO, E. Respostas metabólicas agudas ao exercício físico moderado em ratos wistar. *Motriz*, v.9(2), 87-92, 2003.

ALMEIDA, P. W. M., GOMES-FILHO, A., FERREIRA, A. J., RODRIGUES, C. E. M., DIAS-PEIXOTO, M. F., RUSSO, R. C., TEIXEIRA, M. M., CASSALI, G. D., FERREIRA, E., SANTOS, I. C., GARCIA, A. M. C., SILAMI-GARCIA, E., WILOFF, U., PUSSIELDI, G. A. Swim training suppresses tumor growth in mice. *Appl Physiol*, v. 107, 261–265, 2009.

AMERICAN THORACIC SOCIETY / EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY INTERNATIONAL MULTIDISCIPLINARY CONSENSUS Classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*, v.165(2), 277-304, 2002.

BENÍTEZ, S. C. Bleomicina: un modelo de fibrosis pulmonar. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, v. 19, 53-61, 2006

BARTRAM, U., SPEER, C.P. The role of transforming growth factor β in lung development and disease. *Journal American College of Chest Physicians*, v. 125, 754-765, 2004.

BROEKELMANN, T.J., LIMPER, A.H., COLBYT, T.V., MCDONALD, J.A. Transforming growth factor β_1 is present at sites of extracellular matrix gene

expression in human pulmonary fibrosis. National Academy of Sciences of the United States of American, v. 88, 6642-6646, 1991.

CAHALIN, L. P., MATHIER, M. A., SEMIGRAN, M. J., DEC, G. W., DISALVO, T. G.

The six-minute walk test predicts peak oxygen uptake and survival in patients with advanced heart failure. Chest, v. 110, 325-332, 1996.

CALIARI, M. V. Princípios de Morfometria Digital: KS300 para iniciantes. Ed. UFMG, 149, 1997.

CHAPMAN, H.A. Disorders of lung matrix remodeling. The Journal of Clinical Investigation, v. 113, 148-157, 2004.

CORBEL, M., BOICHOT, E., LAGENTE, V. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 33, 749-754, 2000.

COSTABEL, U., KING, T.E. International consensus statement on idiopathic pulmonary fibrosis. European Respiratory Journal, v. 17, 163-167, 2001.

DESMOULIÈRE, A., REDARD, M., DARBY, I., GABBIANI, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. American Journal of Pathology, v. 146, 56-66, 1995.

ELHALWAGI, B. M., ZHANG, M., IKEGAMI, M., IWAMOTO, H. S., MORRIS, R. E., MILLER, M. L., DIENGER, K., MCCORMACK, F. X. Normal surfactant pool sizes and inhibition-resistant surfactant from mice that overexpress surfactant protein A. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 21(3), 380-387, 1999.

ENTZIAN, P., HÜCKSTÄDT, A., KREIPE, H., BARTH, J. Determination of serum concentrations of type III procollagen peptide in mechanically ventilated patients. *Am Rev Respir Dis*, v. 142, 1079-82, 1990.

GAO, F., KINNULA, V. L., MYLLÄRNIEMI, M., OURY, T. D. Extracellular Superoxide Dismutase in Pulmonary. *Antioxidants & redox Signaling*, v, 10(2), 343–354, 2008.

GEISER, T. Idiopathic pulmonary fibrosis – a disorder of alveolar wound repair? *Swiss Medical Weekly*, v. 133, 405-411, 2003.

GHARAE-KERMANI, M., GYETKO, M.R., HU, B., PHAN, S.H. New Insights into the Pathogenesis and Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Potential Role for Stem Cells in the Lung Parenchyma and Implications for Therapy. *Pharmaceutical Research*, v. 24(5), 819-841, 2007.

GOBATTO, C. A., MELLO, C. Y. S., AZEVEDO, J. R. M., SANTOS, L. A., KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparati e Biochemistry and Physiology*, v.130, 21-27, 2001.

GOLDSTEIN, R.H. Control of type I collagen formation in the lung. *Am J Physiol*, v. 5, L29-40, 1991.

GUERRA, M., MIRANDA, J.A., LEAL, F., VOUGA, L. Interstitial lung disease: Diagnostic accuracy and safety of surgical lung biopsy. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, v. XV(3), 433-442, 2009.

GREENE, K.E., KING JR, T.E., KUROKI, Y., BUCHER-BARTELSON, B., HUNNINGHAKE, G.W., NEWMAN, L.S., NAGAE, H., MASON, R.J. Serum surfactant proteins-A and -D as biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*, v. 19, 439-446, 2002.

HARDIE, W. D., GLASSER, S. W., HAGOOD, J. S. Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis. *Am J Pathol*, v. 175(1), 3-16, 2009.

HONDA, Y., KUROKI, Y., MATSUURA, E., NAGAE, H., TAKAHASHI, H., AKINO, T., ABE, S. Pulmonary surfactant protein D in sera and bronchoalveolar lavage fluids. . *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 152(6), 1860-1866, 1995.

HOLLAND, A. E., HILL, C. J., CONRON, M., MUNRO, P., MCDONALD, C. F. Short termimprovement in exercise capacity and symptoms following exercise training in interstitial lung disease. *Thorax*, v. 63, 549–554, 2008.

INTERNATIONAL CONSENSUS STATEMENT. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 161, 646–664, 2000.

IWANO, M., PLIETH, D., DANOFF, T.M., XUE, C., OKADA, H., NEILSON, E.G. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 110, 341-350, 2002.

JASTRZĘBSKI, D., GUMOLA, A., GAWLIK, R., KOZIELSKI, J. Dyspnea and Quality of Life in Patients With Pulmonary Fibrosis After Six Weeks of Respiratory Rehabilitation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 57(4), 139-148, 2006.

KIM, J. Y., CHOENG, H. C., AHN, C., CHO, S. H. Early and late changes of MMP-2 and MMP-9 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Yonsei Med J*, v. 50(1), 68-77, 2009.

KINNULA, V. L. Redox Imbalance and Lung Fibrosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 10(2), 2008.

KJETIL, A., MARTIN, G.E.M., KOLB, M., GAULDIE, J. Targeting genes for treatment in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Thoracic Society*, v. 3, 389-393, 2006.

KUROKI, Y., AKINO, T. Pulmonary surfactant protein-A (SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 266(5), 3064-3073, 1991.

KUROKI, Y., TAKAHASHI, H., CHIBA, H., AKINO, T. Surfactant proteins A and D: disease markers. *Biochim Biophys Acta*, v. 1408(2-3), 1998.

LAURENT, G.J., MCANULTY, R.J., HILL, M., CHAMBERS, R. Escape from the Matrix Multiple Mechanisms for Fibroblast Activation in Pulmonary Fibrosis. *American Thoracic Society*, v. 5, 311-315, 2008.

LE VINE, A.M., KURAK, K.E., WRIGHAT, J.R., WATFORD, W.T., BRUNO, M.D., ROSS, G.F., WHITSETT, J.A., KORFHAGEN, T.R. Surfactant protein-A binds group B streptococcus enhancing phagocytosis and clearance from lungs of surfactant protein-A deficient mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 20, 279-286, 1999.

MARTINEZ, J.A.B. Interstitial lung diseases. *Simpósio de doenças pulmonares*, v. 31, 247-256, 1998.

MASSENO, A.P.B., PORTO, C.D., NUNES, L.C., SEQUEIRA, J.L., ALVARENGA, M.A. Miofibroblastos: Revisão de Literatura. *Veterinária e Zootecnia*, v. 17(2), 177-190, 2010.

McELROY, M.C., KASPER, M. The use of alveolar epithelial type I cell-selective markers to investigate lung injury and repair. *European Respiratory Journal*, v. 24, 664-673, 2004.

MEDEIROS, A., GIANOLIA, R. M., KALIL, L. M. P., ROSA, L. F. B. C., NEGRÃO, C. E., BRUM, P. C. Efeito do treinamento físico com natação sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos. *Rev. paul. Educ. Fís*, v. 14(1), 7-15, 2000.

MISEROCCHI, G., NEGRINI, D., PASSI, A., DE LUCA, G. Development of lung edema: interstitial fluid dynamics and molecular structure. *News Physiol. Sci.* v. 16, 66-71, 2001.

MIYOSHI, M.H. Surfactant replacement therapy. *Jornal de Pediatria*, v. 77(1), s3-s16, 2001.

MOELLER, A., ASK, K., WARBURTON, D., GAULDIE, J., KOLB, M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol*, v. 40(3), 362-382, 2008.

MOORE, B.B., HOGABOAM, C.M. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 294(2), 152-160, 2007.

MURA, M., FERRETTI, A., FERRO, O., ZOMPATORI, M., CAVALLI, A., SCHIAVINA, M., FABBRI, M. Functional predictors of exertional dyspnea, 6-min

walking distance and HRCT fibrosis score in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration*, v. 73(4), 495-502, 2006.

NANSON, C. J., BURGESS, J. L., ROBIN, M., BERNARD, A. M. Exercise alters serum pneumoprotein concentrations. *Respir Physiol*, v. 127(2-3), 259-265, 2001.

OSTROWSKI, K., ROHDE, T., ASP, S., SCHJERLING, P., PEDERSEN, B. K. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *Journal of Physiology*, v. 515(1), 287-291, 1999.

PAPOTI, M., ALMEIDA, P. B. L., PRADA, F. J. A., ELENO, T. G., HERMINI, H. A., GOBATTO, C. A., MELLO, M. A. R. Maximal lactate steady-state during swimming in rats recovered from protein malnutrition. *Motriz*, v. 9(2), 103 – 110, 2003.

PARDO, A., SELMAN, M. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *American Thoracic Society*, v. 3, 383-388, 2006.

PHAN, S.H. The Myofibroblast in pulmonary fibrosis. *American College of Chest Physicians*, v. 122, 286s-289s, 2002.

REBELLO, C.M., PROENÇA, R.S.M., TROSTER, E.J., JOBE, A.H. Exogenous surfactant therapy – what is established and what still needs to be determined. *Jornal de Pediatria*, v. 78(2), s215-s226, 2002.

RODRIGUES-MACHADO, M.G., ZIN, W.A. Organização morfo-funcional do sistema respiratório. In *Fisiologia respiratória aplicada*. Rocco & Zin. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap.1, 1-11, 2009.

RUBIN, A.S., MOREIRA, J.S., PORTO, N.S., IRION, K.L., MOREIRA, R.F., SCHEIDT, B. Pulmonary idiopathic fibrosis: clinical findings and survival in 132 histologically-proven patients. *Jornal de Pneumologia*, v. 26(2), 61-68, 2000.

RUBIO, S., LACAZE-MASMONTEIL, T., CHAILLEY-HEU, B., KAHN, A., BOURBON, JR., DUCROC, R. Pulmonary surfactant protein A (SP-A) is expressed by epithelial cells of small and large intestine. *J Biol Chem*, v. 270(20), 12162-9, 1995.

RUSSO, R. C., GUABIRABA, R., ROFFÊ, E., SOUZA, A. L., BARCELOS, L. S., GARCIA, C. C., AMARAL, F. A., CASSALI, G. D., BERTINI, R., TEIXEIRA, M. M. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 attenuates bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 40, 410-421, 2009.

SELMAN, M., PARDO, A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respiratory Research*, v. 3(1), 1-8, 2001.

SERRANO-MOLLAR, A., CLOSA, D., CORTIJO, J., MORCILLO, E. J., PRATS, N., GIRONELLA, M., PANÉS, J., ROSELLÓ-CATAFAU, J., BULBENA, O. P-selectin upregulation in bleomycin induced lung injury in rats: effect of N-acetyl-L-cysteine. *Thorax*, v. 57, 629–634, 2002.

SERRANO-MOLLAR, A., CLOSA, D., PRATS, N., BLESA, S., MARTINEZ-LOSA, M., CORTIJO, J., ESTRELA, J.M., MORCILLO, E.J., BULBENA, O. In vivo antioxidant treatment protects against bleomycin-induced lung damage in rats. *British Journal of Pharmacology*, v. 138, 1037-1048, 2003.

SERRANO-MOLLAR, A., NACHER, M., GAY-JORDI, G., CLOSA, D., XAUBET, A., BULBENA, O. Intratracheal transplantation of alveolar type II cells reverses bleomycin-induced lung fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 176, 1261-1268, 2007.

SOUZA, A.B., SANTOS, F.B., NEGRI, E.M., ZIN, W.A., ROCCO, P.R.M. Lung tissue remodeling in the acute respiratory distress syndrome. *Jornal de Pneumologia*, v. 29(4), 235-245, 2003.

SPRUIT, M. A., JANSSEN, D. J. A., FRANSSEN, F. M. E., WOUTERS, E. F. M. Rehabilitation and palliative care in lung fibrosis. *Respirology*, v. 14, 781–787, 2009.

SUGAHARA, K., TOKUMINE, J., TERUYA, K., OSHIRO, T. Alveolar epithelial cells: differentiation and lung injury. *Respirology*, v. 11, 28s-31s, 2006.

TAKAHASHI, H., SANO, H., CHIBA, H., KUROKI, Y. Pulmonary surfactant proteins A and D: innate immune functions and biomarkers for lung diseases. *Curr Pharm Des*, v. 12(5), 589-598, 2006.

THOMEER, M., GRUTTERS, J.C., WUYTS, W.A., WILLEMS, S., DEMEDTS, M.G. Clinical use of biomarkers of survival in pulmonary fibrosis. *Respir Res*, v. 11(89), 2010.

TOEWS, G.B. Cellular alterations in fibroproliferative lung disease. *Chest*, v. 116(1), 112s-116s, 1999.

TOEWS, G.B. Cytokines and the lung. *European Respiratory Journal*, v. 18(34), 3s-17s, 2001.

VIEIRA, R. P., CLAUDINO, R. C., DUARTE, A. C. S., SANTOS, A. B. G., PERINI, A., NETO, H. C. C. F., MAUAD, T., MARTINS, M. A., DOLHNIKOFF, M., CARVALHO, C. R. F. Aerobic Exercise Decreases Chronic Allergic Lung Inflammation and Airway Remodeling in Mice. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 176, 871–877, 2007.

WALLACE, W. A., RAMAGE, E. A., LAMB, D., HOWIE, S. E. A type 2 (Th2- like) pattern of immune response predominates in the pulmonary interstitium of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis (CFA). *Clin Exp Immunol*, v. 101, 436-441, 1995.

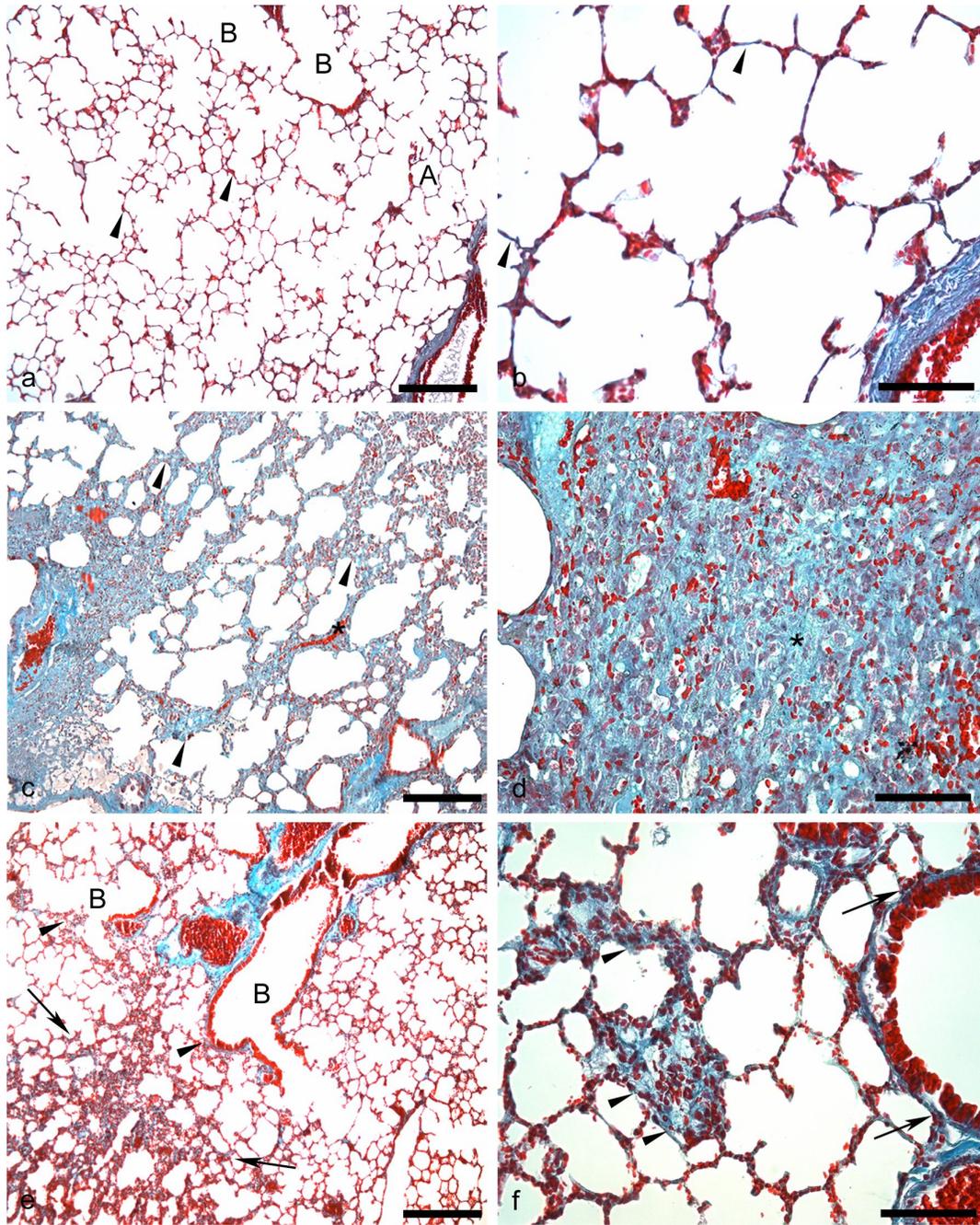
ZHANG, F., NIELSEN, L.D., LUCAS, J.J., MASON, R.J. Transforming growth factor- β antagonizes alveolar type II cell proliferation induced by keratinocyte growth factor. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 31, 679-686, 2004.

9 ANEXOS

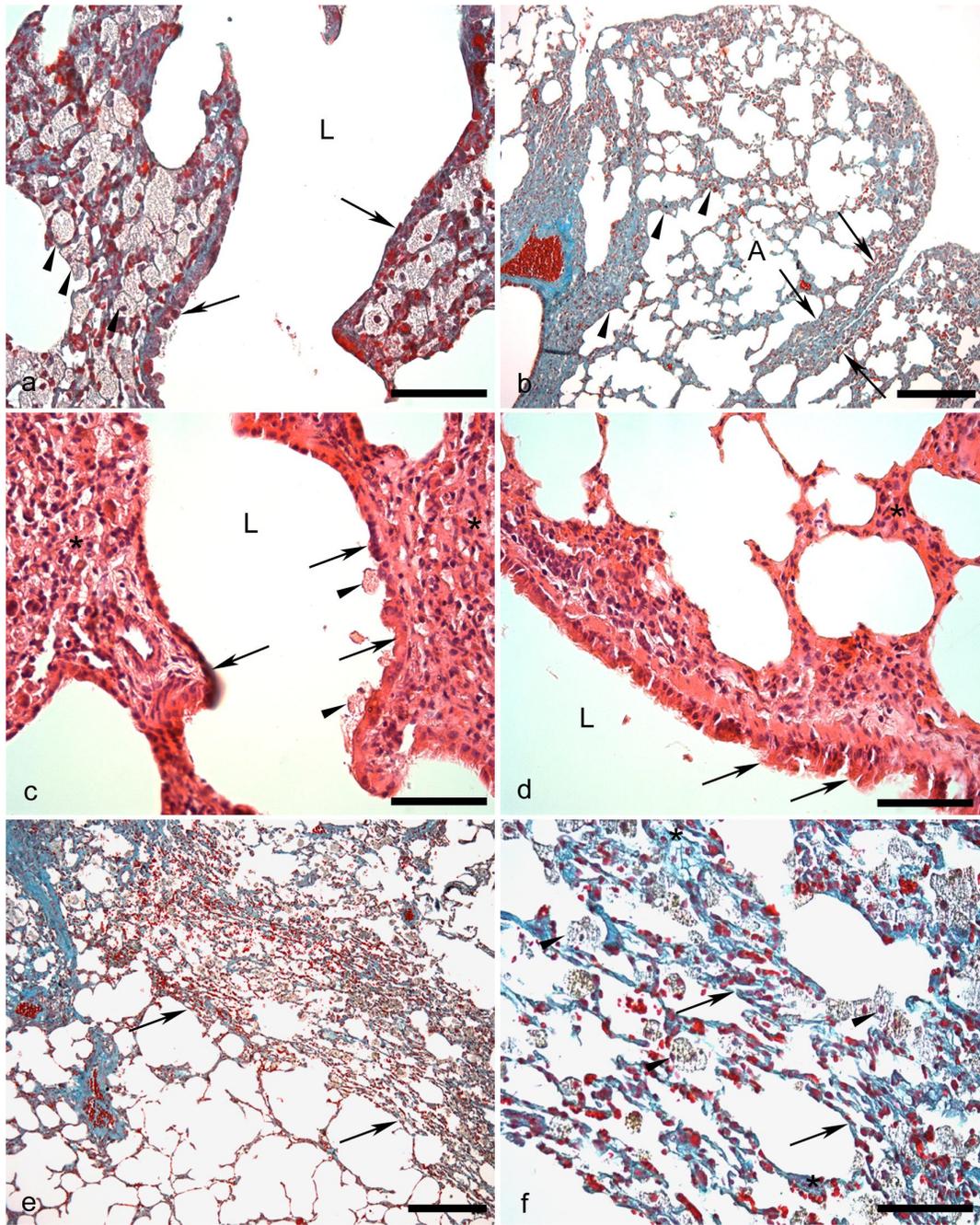
9.1 Figura 3 – Pulmões de camundongos tratados ou não com bleomicina, sedentários ou submetidos à natação. (a) Grupo C-SED: aspecto normal; (b) Grupo BLM-SED: regiões compactas, de coloração branco-avermelhada sugestivas de fibrose (setas); (c) Grupo BLM-EXE: zonas de hemorragia (setas).



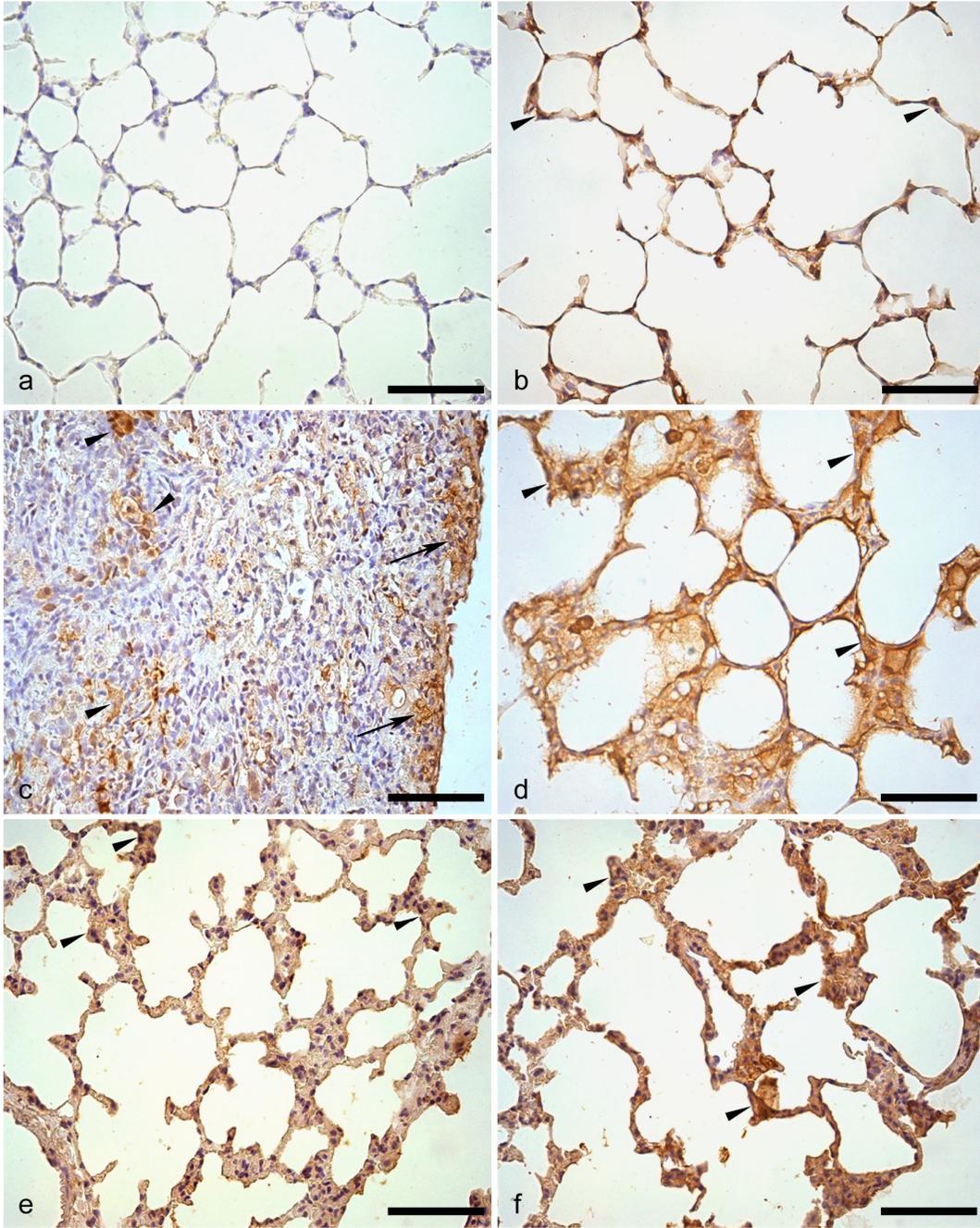
9.2 Figura 4 – Parênquima pulmonar de camundongos tratados ou não com bleomicina, sedentários ou submetidos à natação. (a) Grupo C-SED: septos alveolares de espessura normal (cabeças de seta), bronquíolos respiratórios (B) e alvéolos aerados (A). Barra = 100 μm ; (b) Maior aumento da figura anterior mostrando detalhe do tecido conjuntivo interalveolar corado em verde (cabeças de seta). Barra = 30 μm ; (c) Grupo BLM-SED: grande espessamento dos septos interalveolares (cabeças de seta). Hiperemia (*). Barra = 100 μm ; (d) Grupo BLM-SED: grande espessamento do interstício interalveolar resultante do acúmulo de células e de tecido conjuntivo ricamente vascularizado (*). Barra = 30 μm ; (e) Grupo BLM-EXE: espessamento dos septos interalveolares (setas). Discreta inflamação fibrosante peribronquiolar (cabeças de seta). Bronquíolos respiratórios aerados (B). Barra = 100 μm ; (f) Grupo BLM-EXE: espessamento de septos interalveolares (cabeças de seta). Discreta inflamação fibrosante peribronquiolar (setas). Barra = 100 μm . Tricrômico de Gomori.



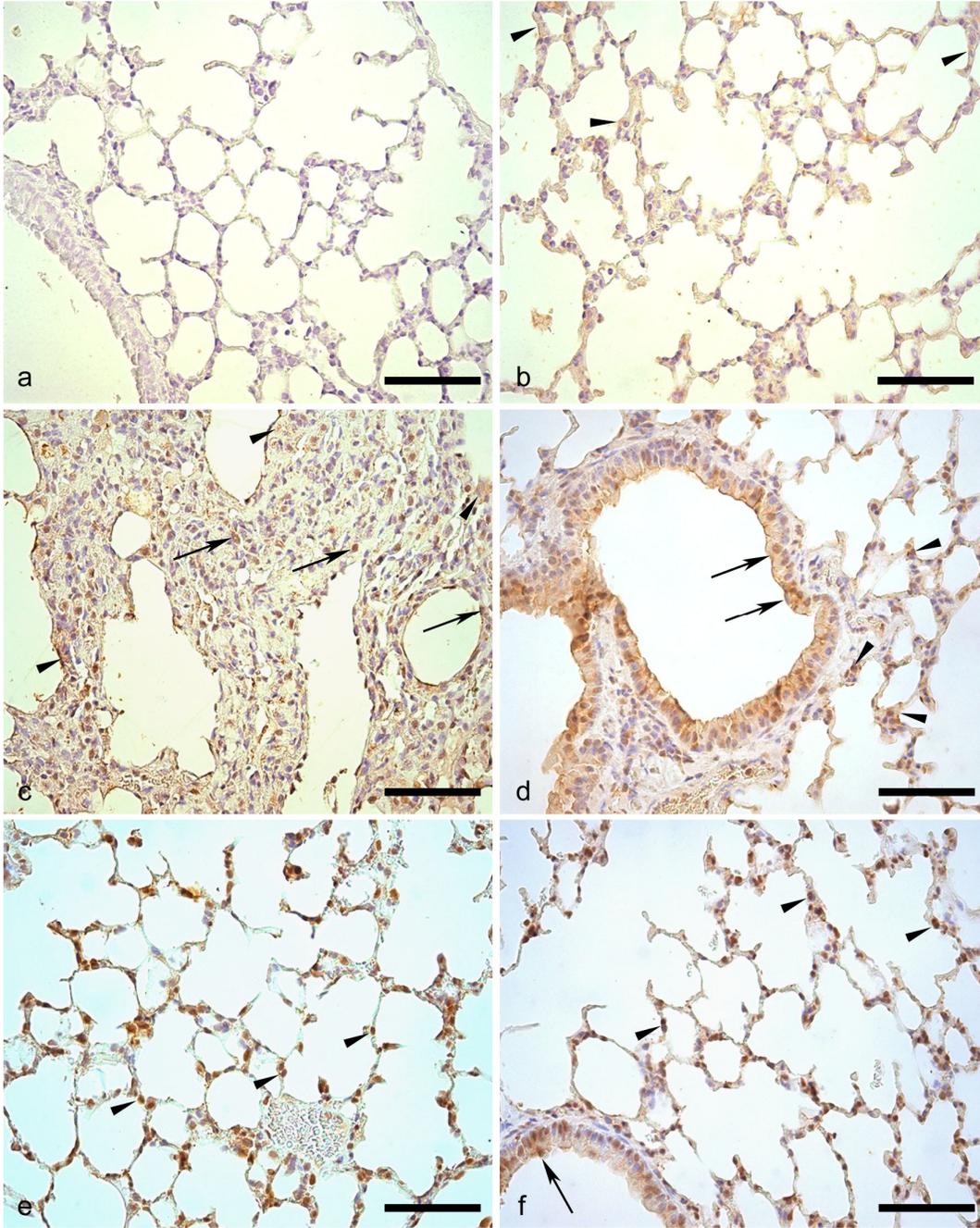
9.3 Figura 5 - Parênquima pulmonar de camundongos sedentários tratados com bleomicina. (a) Grande quantidade de macrófagos alveolares (cabeças de seta) no lúmen alveolar adjacente à parede bronquiolar (setas). Lúmen bronquiolar (L). Barra = 30 μm ; (b) Espessamento dos septos alveolares (cabeças de seta) e interlobulares (setas). Alvéolos aerados (A). Barra = 100 μm ; (c) Necrose de epitélio bronquiolar (setas) associada à presença de macrófagos alveolares em contato com o epitélio (cabeças de seta). Espessamento dos septos interalveolares (*). Lúmen bronquiolar (L). Barra = 30 μm ; (d) Papilas epiteliais bronquiolares projetadas para o lúmen resultantes de hiperplasia regenerativa (setas). Espessamento dos septos interalveolares (*). Lúmen bronquiolar (L). Barra = 30 μm ; (e) Regiões com alvéolos colapsados demonstrando a presença de atelectasia (setas). Barra = 100 μm ; (f) Detalhe da figura anterior mostrando alvéolos colapsados (setas), macrófagos alveolares (cabeças de seta) e espessamento interalveolar principalmente às custas de fibrose (*). Barra = 30 μm ; (a, b, e, f): Tricrômico de Gomori. (c, d): H&E.



9.4 Figura 6 – Reação imuno-histoquímica para colágeno tipo I no parênquima pulmonar de camundongos tratados ou não com bleomicina, sedentários ou submetidos à natação. (a) Controle negativo para colágeno tipo I. Notar ausência de coloração marrom; (b) Grupo C-SED: coloração marrom no interstício alveolar demonstrando reação positiva para colágeno tipo I (cabeças de seta); (c) Grupo BLM-SED: áreas positivas para colágeno tipo I em região de grande espessamento septal interalveolar (cabeças de seta) e subpleural (setas); (d) Grupo BLM-SED: espessamento de septos interalveolares principalmente devido a deposição de colágeno tipo I (cabeças de seta); (e) Grupo BLM-EXE: regiões colágeno tipo I⁺ em septos interalveolares com moderado espessamento (cabeças de seta); (f) Grupo BLM-EXE: espessamento dos septos interalveolares associado a áreas de marcação positiva para colágeno tipo I⁺ (cabeças de seta). Contra-coloração com hematoxilina de Harris. Barra = 30 µm.



9.5 Figura 7 - Reação imuno-histoquímica para SP-A no parênquima pulmonar de camundongos tratados ou não com bleomicina, sedentários ou submetidos à natação. (a) Controle negativo para SP-A. Notar ausência de coloração marrom; (b) Grupo C-SED: coloração marrom nas paredes alveolares (cabeças de seta), mostrando reação positiva para SP-A; (c) Grupo BLM-SED: marcações positivas para SP-A no interstício interalveolar espessado (cabeças de seta) e em grande quantidade de PII (setas); (d) Grupo BLM-SED: marcação positiva para SP-A no epitélio bronquiolar (setas), no interstício interalveolar espessado e em PII (cabeças de seta); (e) Grupo BLM-EXE: PII positivos para SP-A (cabeças de seta) em septos interalveolares de espessura semelhante ao normal; (f) Aspectos semelhantes ao da figura anterior, mostrando reação positiva para SP-A em epitélio bronquiolar (seta) e em PII (cabeças de seta). Contra-coloração com hematoxilina de Harris. Barra = 30 μm .



9.6 Documento de aprovação no Comitê de Ética Experimental Animal da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 - C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 262/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Inflamação pulmonar crônica fibrosante induzida por estresse oxidativo: Efeito do exercício aeróbico sobre a capacidade funcional e as lesões pulmonares**", que tem como responsável(is) **Marcelo Vidigal Caliari**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **11/ 02/2009**.

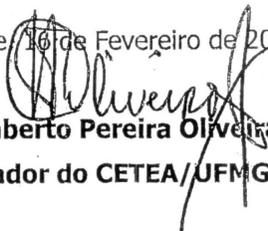
Este certificado expira-se em **11/ 02/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 262/2008**, related to the project entitled "**Chronic pulmonary fibrosing inflammation induced by oxidative stress: effects of aerobic exercise training on functional capacity and pulmonary lesions**", under the supervisors of **Marcelo Vidigal Caliari**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **February 11, 2009**.

This certificate expires in **February 11, 2014**.

Belo Horizonte, 16 de Fevereiro de 2009.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
 Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-904 – Belo Horizonte, MG - Brasil

9.7 Artigo Submetido

Exercise attenuates pulmonary injury in mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis

Luana O Prata,^{1,2} Fabrício M S Oliveira,^{1,2} Tatiana M S Ribeiro,² Pedro W M Almeida,³ Jefferson A Cardoso,² Maria da Glória Rodrigues-Machado,³ Marcelo V Caliar,²

Author details

¹ Programa de Pós-Graduação em Patologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

² Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

³ Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil