

C-2
RICARDO KALAF MUSSI

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
PÓS-ISQUEMIA E REPERFUSÃO PULMONAR
NORMOTÉRMICA EM RATOS SUBMETIDOS
A EXERCÍCIO FÍSICO REGULAR**

CAMPINAS

2006

RICARDO KALAF MUSSI

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
PÓS-ISQUEMIA E REPERFUSÃO PULMONAR
NORMOTÉRMICA EM RATOS SUBMETIDOS
A EXERCÍCIO FÍSICO REGULAR**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor
em Cirurgia, área de concentração em Cirurgia.*

ORIENTADOR: *Prof. Dr. IVAN FELIZARDO CONTRERA TORO*

CAMPINAS

2006

ADRE 306
HAMADA TUNICAMP
M976a
EX
BO BC/ 30902
C. 16.120.06
D. X
CO 11.00
06/12/06
D 393286

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M976a Mussi, Ricardo Kalaf
Avaliação da resposta inflamatória pós-isquemia e reperfusão
pulmonar normotérmica em ratos submetidos a exercício físico regular.
/ Ricardo Kalaf Mussi. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Ivan Felizardo Contrera Toro
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Isquemia. 2. Reperfusão (Fisiologia). 3. Pulmões. 4.
Inflamação. 5. Treinamento. I. Toro, Ivan Felizardo Contrera. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

**Título em ingles: Evaluation of the inflammatory response in normothermic
pulmonary ischemia and reperfusion in mice undergone to physical regular
exercise**

Keywords:

- Ischemia
- Reperfusion (Physiology)
- Lung
- Inflammation
- Training

Área de concentração: Cirurgia

Titulação: Doutorado em Cirurgia

Banca examinadora:

Profª.Drª. Ivan Felizardo Contrera Toro

Profª Drª Evaldo Marchi

Profª Drª Paulo Francisco Guerreiro Cardoso

Profª Drª Ilma Aparecida Paschoal

Profª Drª Desanka Dragosavac

Data da defesa: 26 / 05 / 2006

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno: RICARDO KALAF MUSSI

Orientador: Prof. Dr. IVAN FELIZARDO CONTRERA TORO

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

**Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 26/05/2006

Dedico este trabalho...

Em especial ao meu pai Nicolau (in memoriam), obrigado por ter renunciado a tantos sonhos em vida para que os meus se realizassem. Guerreiro incansável, onde quer que esteja, certamente estará realizado com a conclusão desta missão.

À minha mãe Lourdes, pelos importantes ensinamentos e por ter sempre acreditado em mim.

Ao meu tio José Michel, grande homem em todos os aspectos. Visionário, seu exemplo e constante estímulo me fizeram gostar tanto da medicina e chegar até aqui.

À grande companheira, Andréa, uma verdadeira esposa, de amor e dedicação infinita ao próximo, e que além da sua dura rotina profissional ocupa com voluntariedade e temura a lacuna deixada por mim no cotidiano dos nossos filhos, para que eu possa satisfazer a minha curiosidade científica e assim concluir novas fases de nossas vidas.

Aos meus filhos Nicholas que ainda jovem demonstra enorme força para vencer uma grande adversidade, e as queridas Carolina e Valentina, que trouxeram grande motivação para o meu viver.

Inquietos, provocam reflexões em nossos conceitos e condutas, ajudando a conhecer-nos melhor e encontrar o real valor de nossas vidas. Certamente entenderão minha ausência, pois não se alcança um ideal sem a correspondente dedicação.

A minha formação acadêmica teve algumas interrupções intencionais e outras inerentes à minha vontade. Após o término da Residência Médica em Cirurgia Geral e Torácica, passaram-se 12 anos, para concluir o Mestrado e agora o Doutorado incluindo treinamento em Cirurgia Cardiovascular.

No entanto, neste período não deixei de buscar a associação da investigação científica em assuntos específicos do meu gosto com a universalidade do saber na área cirúrgica, notadamente na cirurgia torácica.

Seria uma injustiça deixar somente o meu nome e do meu orientador na capa deste trabalho, pois neste período muitas pessoas foram importantes. Por isso, agradeço à minha formação profissional e à elaboração deste trabalho.

Ao eterno Prof. Dr. Carlos Frazatto Jr, grande incentivador, motivador e decano da cirurgia torácica no Brasil, sempre inquieto e permanentemente disposto a ensinar, o meu afetuoso obrigado.

Ao Prof. Dr. Ivan Felizardo Contrera Toro, não apenas o orientador desta tese, amigo sempre acessível, solidário e de elevada espiritualidade. Agradeço a oportunidade de aprender e conviver com você, desde os meus tempos de graduação.

Ao Dr. José Geraldo dos Santos e Dr. José Cláudio Seabra, grandes médicos e seres humanos, agradeço pela convivência fraterna, harmônica e respeitosa na Disciplina de Cirurgia Torácica da Unicamp.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, Profa. Dra. Ellen Landucci e Profa. Dra. Angelina Zanesco pela oportunidade de viabilizar esta parceria clínico-experimental, e assim buscar as respostas no laboratório para muitas de nossas dúvidas da prática médica diária.

À Profa. Dra. Ilma Aparecida Paschoal, sempre disposta a contribuir com seu vasto conhecimento técnico-científico, professora universitária no sentido maior, difundindo o universo do conhecimento.

Ao Prof. Dr. João Bosco de Oliveira, cirurgião hábil e brilhante, pelo exemplo de perseverança e inquietude na investigação científica e no refinamento da técnica operatória.

Ao Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto, coordenador da Pós-Graduação em Cirurgia no início deste projeto, pelo incentivo e apoio logístico.

Ao Prof. Dr. Nelson Adami Andreollo, por quem sempre tive grande respeito e consideração desde a graduação através da minha iniciação científica, e agora colaborando nesta fase final de pesquisa na condição de coordenador da Pós-Graduação em Cirurgia.

Aos meus amigos Dr. José Eduardo Nascimento Delamain e Dr. Alexandre Garcia de Lima pelo companheirismo, parceria e empolgação na atividade diária da cirurgia torácica.

Ao Dr. Antonio Maria da Fonseca, pelo incentivo de escolher a cirurgia torácica como especialidade.

À Profa. Dra. Rosana Celestino Morandim (NMCE) pela importante participação na elaboração do procedimento anestésico-cirúrgico deste modelo.

Ao Enilton Camargo; prezado amigo, tive a imensa satisfação de contar com você na execução deste projeto com alegria, espiritualidade e honestidade científica.

À Tatiana Ferreira e Dra. Suzan Brancher na configuração e aplicação do modelo experimental.

À Sra. Maria do Rosário Zullo e Cyrene O.S.F.A. Camargo, pela editoração e correção gramatical respectivamente e pelo grande empenho profissional.

Aos amigos Rogério Ulbrich e Jorge Bonassa, da Intermed®, pela atenção e contribuição dispensadas ao projeto.

A todos os meus mestres, do Primário à Universidade, cada um, à sua maneira, contribuindo na minha formação, pois souberam que a transmissão do conhecimento e a pesquisa científica são bens universais e jamais devem ser limitados.

A todos os alunos e residentes que, através de seus questionamentos, estimulam-nos a evoluir cientificamente.

A todos que, de uma forma ou de outra, ajudaram neste trabalho ou em qualquer momento de minha vida e não lembrados agora, mesmo porque foram muitos; sou-lhes eternamente grato.

	PÁG.
RESUMO.....	xxvii
ABSTRACT.....	xxxí
1- INTRODUÇÃO.....	35
1.1- Considerações gerais.....	37
1.2- Síndrome do desconforto respiratório agudo.....	39
1.3- Isquemia e reperfusão.....	40
1.4- Isquemia e reperfusão pulmonar.....	42
1.4.1- Em relação ao endotélio pulmonar.....	42
1.4.2- Em relação aos radicais livres e ao estresse oxidativo.....	46
1.5- Resposta inflamatória na isquemia e reperfusão pulmonar..	59
1.5.1- Em relação ao macrófagos alveolares.....	59
1.5.2- Em relação à ativação neutrofílica.....	60
1.5.3- Em relação as interleucinas.....	62
1.6- O exercício físico e suas alterações na resposta inflamatória.....	66
2- OBJETIVOS.....	71
3- SUJEITOS E MÉTODO.....	75
3.1- Animais de experimentação.....	77
3.1.1- Grupos experimentais.....	77

3.2- Procedimento experimental.....	78
3.2.1- Programa de exercício físico dinâmico.....	78
3.2.2- Procedimento operatório.....	79
3.3- Determinação do número de leucócitos circulantes.....	82
3.4- Índice da permeabilidade vascular nos pulmões direito e esquerdo.....	82
3.5- Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO) nos pulmões direito e esquerdo.....	82
3.6- Determinação de citocinas séricas.....	83
4- RESULTADOS.....	85
4.1- Peso corpóreo.....	87
4.2- Número de leucócitos circulantes.....	87
4.3- Índice de permeabilidade vascular.....	87
4.4- Infiltrado de neutrófilos nos pulmões (atividade da mieloperoxidase).....	87
4.5- Níveis de citocinas séricas.....	88
5- DISCUSSÃO.....	95
5.1- Modelo experimental.....	97
5.2- Repercussões da isquemia pulmonar.....	101
5.3- Repercussões na permeabilidade vascular pulmonar.....	103
5.4- Repercussões no influxo neutrofilico.....	106
5.5- Repercussões nos mediadores inflamatórios.....	108
5.6- Resposta inflamatória remota.....	111
5.7- Considerações finais.....	113

6- CONCLUSÕES.....	117
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
8- BIBLIOGRAFIA DE NORMATIZAÇÕES.....	147
9- ANEXOS.....	151
Anexo 1- Planilhas das medidas avaliadas neste estudo.....	153
Anexo 2- Carta de aprovação do Cômite de Ética em Pesquisa Experimental.....	157

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
°C	Graus Celsius
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
C5a	Fração do complemento 5a
Ca ⁺²	Íon cálcio
CD 18	Receptor de molécula de adesão de neutrófilos
CEC	Circulação extracorpórea
cm	Centímetro
COX-2	Ciclooxigenase
DMOS	Disfunção de múltiplos órgãos e sistemas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
e ⁻	Elétron
ERTO	Espécies reativas tóxicas do oxigênio
F	French
Fe ⁺²	Cátion ferroso
Fe ⁺³	Cátion férrico
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
FMOS	Falência de múltiplos órgãos e sistemas
GSH	Glutathiona reduzida
GSH-PX	Glutathiona peroxidase
H ⁺	Íon hidrogênio
H ₂ O	Molécula de água
H ₂ O ₂	Radical peróxido

HOCL	Ácido hipocloroso
HSP	Heat shock protein
HTAB	Brometo de hexadecil trimetil amônio
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
I/R	Isquemia e reperfusão
I¹²⁵	Radioisótopo 125 do Iodo
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IL-10	Interleucina 10
IL1-ra	Receptor antagonista da interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de massa corpórea
iNOs	Óxido nítrico sintase indutível
IR/SD	Grupo submetido à isquemia e reperfusão sedentário
IR/TREIN	Grupo submetido à isquemia e reperfusão treinado
IRP	Isquemia e reperfusão pulmonar
Kg	Quilograma
km/h	Quilômetro por hora
LOOH⁻	Hidroperóxido lipídico
LPA	Lesão pulmonar aguda
LPS	Lipopolissacáride
LTB4	Leucotrieno B4
m	Metro
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimol
MPO	Mieloperoxidase

NADP	Nicotinamida difosfato de adenosina
NADPH	Nicotinamida difosfato de adenosina reduzida
NF-kappa B	Fator nuclear kappa B
NH₃	Amônia
nM	Nanomol
NO	Óxido nítrico
O₂	Oxigênio molecular
O₂⁻	Radical superóxido
OH⁻	Radical hidroxila
ONOOO⁻⁴	Peroxinitrito
PCR	Proteína C reativa
PL	Peroxidação lipídica
PVP	Permeabilidade vascular pulmonar
RVP	Resistência vascular pulmonar
SARA	Síndrome da angústia respiratória aguda
SAT	<i>Status</i> antioxidante total
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
seg	Segundos
SOD	Superóxido dismutase
SRIS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
sTNF-R	Receptor de superfície do fator de necrose tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
UI	Unidade internacional
UMPO	Unidades de mieloperoxidase
VO_{2 max}	Consumo máximo de oxigênio
μCi	miliCurie
μl	Microlitro
μmol	Micromol

RESUMO

Objetivos: A proposta deste estudo foi avaliar os efeitos do treinamento físico na resposta inflamatória (permeabilidade vascular e influxo neutrofílico) após isquemia-reperfusão pulmonar (IRP) em ratos. Considerando que o treinamento físico tem propriedades protetoras em determinadas doenças cardiovasculares, hipotetizamos que animais submetidos a treinamento com exercício físico podem ficar protegidos contra a lesão causada pela isquemia e reperfusão pulmonar.

Métodos: ratos Wistar machos (pesando entre 350g e 450g) foram divididos em três grupos: *sham* operados (SHAM); animais sedentários submetidos à isquemia-reperfusão (IR/SD) e animais treinados submetidos à isquemia-reperfusão (IR/TR). Animais treinados foram submetidos a um programa de oito semanas de treinamento em corrida, com sessões de 60min por dia, cinco dias por semana. Os ratos foram anestesiados e ventilados artificialmente. Após a toracotomia, a artéria pulmonar esquerda, o brônquio principal esquerdo e a veia pulmonar esquerda foram clampeados, mantendo o pulmão inflado parcialmente por 90 minutos. O clampe foi então removido e os pulmões voltaram a ventilar, e foram reperfundidos por duas horas. A circulação pulmonar foi perfundida através do tronco arterial pulmonar com solução salina. O extravasamento de proteína plasmática foi medido através do acúmulo de albumina sérica marcada com I^{125} em ambos os pulmões, enquanto que a infiltração neutrofílica foi medida através da atividade de mieloperoxidase (MPO).

Resultados: Após oito semanas de treinamento em corrida, o peso corpóreo foi significativamente menor em 15% no grupo treinado comparado com o do grupo sedentário ($p < 0,05$). A contagem de células mononucleares e polimorfonucleares em ratos treinados não se altera significativamente quando comparada à dos ratos sedentários. A IRP causou acentuado aumento ($p < 0,05$) na permeabilidade vascular e na atividade da mieloperoxidase do pulmão direito dos animais sedentários. O condicionamento físico dos animais atenuou significativamente ($p < 0,05$) a elevação da permeabilidade vascular, sem afetar o influxo neutrofílico. O protocolo de isquemia e reperfusão também resultou em níveis elevados de IL-1 β e TNF- α no grupo sedentário, e foram revertidos pelo programa de treinamento em corrida. Os níveis séricos de IL-10 não foram alterados nos três grupos.

Conclusões: Os dados deste estudo

mostram que o condicionamento físico atenua a elevação da permeabilidade vascular, mas não o influxo neutrofílico induzido pela isquemia-reperfusão em ratos. Estes dados sugerem que o treinamento físico age no componente vascular mas não no celular da resposta inflamatória, deste modelo, protegendo contra a lesão pulmonar causada pela isquemia-reperfusão.

ABSTRACT

Objective: The purpose of this study was to evaluate the effects of exercise training on the inflammatory response (vascular permeability and neutrophil influx) after lung ischemia-reperfusion in rats. Considering that exercise training have protective properties in certain cardiovascular disease, we hypothesized that animals undergoing exercise physical training would be protective against direct lung ischemia-reperfusion injury. **Methods:** Male Wistar rats (weighing 350g and 450g) were divided into three groups: *Sham* operated (*SHAM*); sedentary animals submitted to ischemia-reperfusion (IR/SD) and trained animals submitted to ischemia-reperfusion (IR/TR). Trained animals underwent 8 weeks of run training program in sessions of 60 min/day, 5 days/week. Rats were anesthetized and artificially ventilated. After thoracotomy, the left pulmonary artery, bronchus and pulmonary vein were occluded, maintaining the lung in a partially inflated state for 90min. The clamp was then removed, and lungs were allowed to ventilate and reperfuse for 2h. The pulmonary circulation was flushed through the main pulmonary artery with saline solution. Protein plasma extravasation was measured as accumulation of human serum albumin labeled with I^{125} in the both lung tissues, whereas neutrophil infiltration was measured as the myeloperoxidase (MPO) activity. **Results:** After 8 weeks of run training, the body weight was significantly 15% lower in trained groups compared with the sedentary group ($p<0.05$). Counts of mononuclear and polymorphonuclear cells in trained rats did not significantly changed compared with sedentary rats. The lung ischemia-reperfusion caused a marked increase ($p<0.05$) in vascular permeability and MPO activity in the right lung of sedentary animals. The physical preconditioning of the animals significantly attenuated ($p<0.05$) the increased vascular permeability, without affecting the neutrophil influx. The ischemia-reperfusion protocols also resulted in increased levels of serum IL-1 β and TNF- α in sedentary group, and that was reversed by run training program. The serum levels IL-10 were not altered in all groups. **Conclusions:** Our data show that physical preconditioning attenuate the increased vascular permeability but not the neutrophil influx induced by rat lung ischemia-reperfusion. This data suggests that physical training act in the vascular (but not in the cellular) component of the inflammatory response to protect against the injury caused by lung ischemia-reperfusion.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Considerações gerais

A interrupção do fornecimento de sangue e oxigênio para os tecidos do organismo desencadeia uma série de eventos fisiopatológicos atualmente bem caracterizados.

Os efeitos da isquemia na célula são há muito tempo conhecidos. O principal meio de minimizar a lesão causada por isquemia consiste em restabelecer o fluxo sanguíneo interrompido.

Contudo, parte da lesão pós-isquêmica decorre da reperfusão, o que pode ampliar a lesão iniciada na isquemia e até mesmo precipitar a morte celular e necrose, caracterizando a lesão de reperfusão ou também chamada lesão de isquemia-reperfusão (McCord, 1985).

Embora as arritmias de reperfusão do miocárdio isquêmico tivessem sido descritas desde 1935 por ¹Tennant e Wiggers, foram Hearse et al. (1973), os primeiros a introduzir o termo lesão de reperfusão, ao demonstrarem a liberação de enzimas intracelulares na reperfusão do miocárdio isquêmico (Das, 1994).

O evento de isquemia e reperfusão de determinado órgão ou sistema constitui evento fisiopatológico comum a numerosas doenças da prática clínica diária. São exemplos a doença coronariana, as trombooses arteriais, os acidentes vasculares cerebrais, as embolias pulmonar e de extremidades. Mais recentemente, os transplantes de órgãos como rim, coração, fígado e pulmão isoladamente constituem também exemplos de procedimentos que envolvem a isquemia-reperfusão de órgãos.

Uma situação mais complexa ocorre quando se lida com a isquemia-reperfusão, não de um órgão isolado, mas de vários órgãos ao mesmo tempo, como ocorrem nos estados de choque de qualquer etiologia, nas cirurgias com utilização de circulação extracorpórea (CEC) ou que envolvam pinçamento e

¹ Tennant R, Wiggers, C, 1935 apud Das DK. Cellular, biochemical and molecular aspects of reperfusion. Introduction. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 723:12-6.

despinçamento arterial da aorta. Em todas as circunstâncias não apenas ocorre o dano do órgão-alvo, como também alterações a distância ou denominadas remotas.

A isquemia e reperfusão pulmonar podem ocorrer em muitas situações que envolvem a cirurgia pulmonar, associada ou não com a circulação extracorpórea.

Todas as manifestações sistêmicas decorrentes da isquemia e reperfusão são amparadas pelo comprometimento global da microcirculação, o que pode ocasionar a Síndrome do Desconforto Respiratório do Adulto e a Falência de Múltiplos Órgãos e Sistemas, com elevado índice de morbidade, que apesar dos avanços tecnológicos das terapias de suporte podem superar 50% de mortalidade (Brun-Buisson, 2000).

Estudos clínicos e experimentais têm sido realizados a fim de demonstrar estratégias para o tratamento e prevenção da lesão causada pela isquemia e reperfusão pulmonar (IRP) (Eppinger et al., 1995; Fiser et al., 2001a;b; Krishnadasan et al., 2003; Tagawa et al., 2003; Ito et al., 2004; Krishnadasan et al., 2004; Maxey et al., 2004).

Pode-se tentar inibir a lesão tecidual na injúria de isquemia e reperfusão de várias maneiras, dentre elas controlando a resposta inflamatória. O melhor conhecimento dos mediadores inflamatórios tem sido motivo de muitos estudos, com o intuito de modular a resposta inflamatória no tratamento de pacientes em estados patológicos agudos e crônicos (Khimenko et al., 1998; Brun-Buisson, 2000; Fiser et al., 2001a;b; Krishnadasan et al., 2003; Krishnadasan et al., 2004; Bathia e Mochhala, 2004; Maxey et al., 2004).

No entanto, as repercussões locais e remotas deste processo estão intercorrelacionadas em um complexo e sutil conjunto de agentes pró e antiinflamatórios, a fim de manter a homeostase física.

O exercício físico dinâmico regular é considerado uma maneira fisiológica de modulação do processo inflamatório, sendo medida efetiva na prevenção e controle de muitas doenças crônico-degenerativas e neoplásicas, o que o torna um importante adjuvante no controle da inflamação crônica de baixo

grau, conceito introduzido para designar condições em que as principais citocinas inflamatórias estão significativamente elevadas (Ostrowski et al., 1999; 2000; Maiorana et al., 2003; Lennon et al., 2004; Petersen e Pedersen, 2005).

Com a finalidade de implementar uma linha de pesquisa nesta área foi desenvolvido na Disciplina de Cirurgia Torácica, em conjunto com o Departamento de Farmacologia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) um modelo experimental em ratos submetidos a treinamento físico regular por oito semanas, e, quando operados, provocou-se isquemia e reperfusão pulmonar, seguida da avaliação das possíveis alterações nas respostas inflamatórias locais e sistêmicas neste modelo.

1.2- Síndrome do desconforto respiratório agudo

A síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA) foi primeiramente descrita em 1967 por Ashbaugh e colaboradores, em um grupo bastante heterogêneo de doentes. Estes autores descreveram uma série de indivíduos que estavam taquidispnéicos, com hipóxia refratária, redução da complacência pulmonar e infiltrado alveolar difuso no radiograma de tórax, sendo o primeiro a reconhecer uma série de insultos que poderiam constituir esta síndrome.

A SARA é descrita como uma síndrome de inflamação com aumento da permeabilidade alvéolo-capilar e o termo lesão pulmonar aguda (LPA) é utilizado para definir a contínua resposta patológica da lesão do parênquima pulmonar. A definição de SARA tem sido modificada e tornou-se menos laboratorial e mais clínica. Em 1994, *the American-European Consensus Conference Committee* propôs o termo síndrome da angústia respiratória aguda, uma vez que esta síndrome não é limitada ao adulto (Bernard et al., 1994).

Define-se SARA como uma forma severa de LPA, constituindo uma síndrome de inflamação pulmonar aguda, que resulta em aumento da permeabilidade do endotélio capilar.

As diferentes etiologias da SARA são caracterizadas por uma resposta inflamatória localizada em diferentes órgãos, em que os mediadores inflamatórios são liberados na circulação. A severidade do ataque da SARA parece ser determinado pela magnitude da resposta inflamatória sistêmica (SRIS). Em termos gerais, a SRIS é uma resposta integralmente normal a uma determinada injúria, e a sepse, por exemplo, seria definida como uma SRIS em que existe um foco identificável de infecção (Bathia e Moochhala, 2004).

A SARA pode estar associada a várias desordens clínicas, que devem ser divididas em lesões diretas no pulmão e aquelas que indiretamente lesam o pulmão, decorrente de processos sistêmicos. Entre as causas indiretas incluem-se sepse, choque, trauma extratorácico severo, fraturas múltiplas e politransfusões, entre outras.

Entre as causas diretas podem-se citar aspiração, pneumonia, contusão pulmonar, inalação tóxica, tromboembolismo pulmonar, procedimentos utilizando circulação extracorpórea, ressecções pulmonares com clampeamento da artéria pulmonar e a lesão causada pela isquemia e reperfusão no transplante pulmonar.

A ativação leucocitária sistêmica (mediada por citocinas) é uma manifestação direta da resposta inflamatória generalizada e, quando excessiva, pode levar à falência múltipla de órgãos como consequência de uma exagerada resposta à SRIS. Os leucócitos tornam-se ativados na circulação e alguns se alojam dentro da microcirculação pulmonar. Nesta condição, leucócitos migram para o interstício pulmonar e aumentam a permeabilidade endotelial, levando ao edema tissular. Os leucócitos nos pulmões respondem e contribuem para o processo inflamatório na SARA (Weinacker e Vaszar, 2001; Tasaka et al., 2002).

1.3- Isquemia e reperfusão

A palavra isquemia é de origem grega: *ischeim* (supressão) e *haima* (sangue).

O suprimento de oxigênio às células e tecidos é fator central na manutenção das funções e integridade tecidual.

A isquemia é a interrupção do fornecimento de sangue e oxigênio para os tecidos do organismo, desencadeando uma série de eventos fisiopatológicos bem caracterizados. Os efeitos da isquemia na célula são há muito tempo conhecidos. O evento isquemia-reperfusão, entretanto, não é totalmente dependente do período de isquemia. Esses eventos ocorrem de forma seqüencial e caracterizam-se por alterações bioquímicas com depleção dos estoques de trifosfato de adenosina (ATP), disfunções da membrana plasmática, influxo intracelular de cálcio e sódio, ativação de proteases e alterações morfológicas nas células como o edema celular isquêmico. Caso não seja restabelecido o suprimento sangüíneo, essas alterações podem tornar-se irreversíveis, com conseqüente morte celular e necrose (Scannell, 1996).

A susceptibilidade celular durante o tempo de isquemia varia entre órgãos, e, em um mesmo órgão, entre células. As causas para essas diferenças ainda não foram bem estabelecidas. O restabelecimento da perfusão após um período isquêmico, a reperfusão, constitui a única medida capaz de reverter esse processo. Entretanto, a reperfusão pode, em determinadas situações, ampliar a lesão iniciada na isquemia e até mesmo precipitar a morte celular, caracterizando a lesão de reperfusão ou também chamada de lesão pós-isquêmica, ou ainda, lesão de isquemia-reperfusão (McCord, 1985).

A importância de estudar-se a lesão de isquemia-reperfusão com o enfoque sistêmico decorre de que ela está, em geral, associada a um comprometimento global da microcirculação e esta, por sua vez, está envolvida nas fisiopatologias da Disfunção de Múltiplos Órgãos e Sistemas (DMOS) e da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) (Cipolle et al., 1993). Essas duas situações clínicas têm elevados índices de morbidade e mortalidade, apesar dos grandes avanços tecnológicos nas terapias de suporte nos últimos anos. A lesão por isquemia e reperfusão tem uma elevação paradoxal no dano tissular durante o período de reperfusão, quando comparada a diferentes períodos de isquemia (Parks e Granger, 1986).

1.4- Isquemia e reperfusão pulmonar

A lesão de isquemia e reperfusão pulmonar (IRP) é associada com um aumento da permeabilidade vascular, que se manifesta patologicamente por um edema pulmonar infiltrado por células inflamatórias (Meyers et al., 1999).

O multifacetado fenômeno que envolve a IRP inclui vários componentes, entre eles macrófagos alveolares, células endoteliais, ativação de neutrófilos, radicais livres, sistema xantina-oxidase, adesão leucocitária, cascata do complemento e uma riqueza de citocinas como TNF- α , interleucina 1 β , interleucina 6, interleucina 8, interleucina 10, entre outras (de Perrot et al., 2003).

Comumente, a isquemia e reperfusão correspondem à anóxia-reoxigenação nos órgãos transplantados. Contudo, os pulmões são considerados diferentes, pois contêm oxigênio nos alvéolos durante a preservação isquêmica. O oxigênio alveolar ajuda a manter o metabolismo aeróbico, prevenindo a anóxia. Por isso, nos pulmões, o estresse oxidativo resultante da isquemia deve ser distinguido daquele resultante da hipóxia de outros órgãos (Fisher et al., 1991; Eckenhoff et al., 1992; Date et al., 1993).

1.4.1- Em relação ao endotélio pulmonar

As células endoteliais dos vasos pulmonares são do tipo contínua (não- fenestrada). São orientadas no eixo axial dos vasos, provavelmente como resultado de vetores longitudinais gerados pelas forças de estiramento do fluxo sanguíneo. O conceito de que a célula endotelial funciona como uma simples barreira à permeabilidade de íons ou outras moléculas modificou-se nos últimos 20 anos. A descoberta de que o endotélio produz um grande número de substâncias químicas que regulam ativamente o tônus e a dinâmica vascular contribui para isso, pois tanto a isquemia quanto a reperfusão causam disfunção da célula endotelial. Esta disfunção caracteriza-se pela perda do controle do tônus vascular e ao mesmo tempo favorece o surgimento de fatores que promovem a

adesão, a agregação e a migração de polimorfonucleares ao território pós-isquêmico (Lefer e Lefer, 1993; Kurose e Granger, 1994).

A célula endotelial exerce controle do tônus vasomotor através da produção balanceada de várias substâncias vasoativas. Dentre as substâncias produzidas pelo endotélio, a prostaciclina, o óxido nítrico (NO), as endotelinas e o tromboxano merecem comentários. As duas primeiras têm ação vasodilatadora enquanto as duas últimas são vasoconstrictoras. Elas são produzidas continuamente pela célula endotelial em resposta a vários estímulos mecânicos ou bioquímicos, e alteram o tônus vascular de modo a ajustar o fluxo sanguíneo à demanda metabólica dos tecidos. Isto ocorre tanto em situações fisiológicas como no exercício físico e também em situações patológicas, como na reperfusão (Maier e Bulger, 1996a).

O endotélio parece ser uma das fontes predominantes de oxidantes durante a isquemia pulmonar não-hipóxica (Al Mehdi et al., 1998a). As células endoteliais são altamente sensíveis às forças físicas resultantes da variação do fluxo sanguíneo e são capazes de transformar estas forças mecânicas em sinais elétricos e bioquímicos (mecanotransdução) (Lansman, 1988). A ausência do componente mecânico do fluxo sanguíneo durante a isquemia estimula a despolarização da membrana das células endoteliais com ativação da NADPH-oxidase, fator nuclear kappa B e síntese do óxido nítrico dependente do cálcio/modulina (Al Mehdi, 1998a; 1998b).

A célula endotelial pulmonar constitui-se a fonte e o alvo principal para os radicais livres formados na reperfusão, sofrendo uma série de alterações bioquímicas e morfológicas. Estas alterações propiciam a interação da célula endotelial com leucócitos polimorfonucleares e plaquetas, compondo o elemento fundamental para a disfunção microvascular (Orfanos et al., 2004).

As alterações da microcirculação comprometem progressivamente a função das células parenquimatosas adjacentes, podendo ocasionar a disfunção do órgão em questão. As disfunções seriam tanto mais intensas quanto maior o grau de lesão microvascular. A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) dos neutrófilos tem sido usada como indicador da presença dessas células. É observado um aumento

de cinco a sete vezes na atividade da MPO durante a isquemia, seguido de um aumento de 18 vezes na reperfusão. Tanto o tratamento com superóxido dismutase (varredor de radicais O_2^-), alopurinol ou deferoxamina - um quelante de ferro - atenuaram o aumento de atividade da MPO (Zimmerman et al.,1990). Esses resultados levaram à hipótese de que as espécies tóxicas reativas do oxigênio ERTO derivadas da cascata da xantina-oxidase, produzidas especialmente pela célula endotelial, liberariam mediadores inflamatórios e quimiotáticos, promovendo a ativação e a infiltração de neutrófilos. Diversos fatores favorecem a adesão, a infiltração e a migração de leucócitos ao tecido pós-isquêmico, como a inibição de óxido nítrico (NO), a liberação de quimiotáticos como os leucotrienos (LTB4), o fator ativador plaquetário e componentes do sistema complemento (C5a) e a indução de moléculas de adesão na superfície da célula endotelial e dos neutrófilos. A figura 1 ilustra os principais mecanismos de lesão endotelial e tecidual por isquemia-reperfusão e realça a participação dos radicais livres.

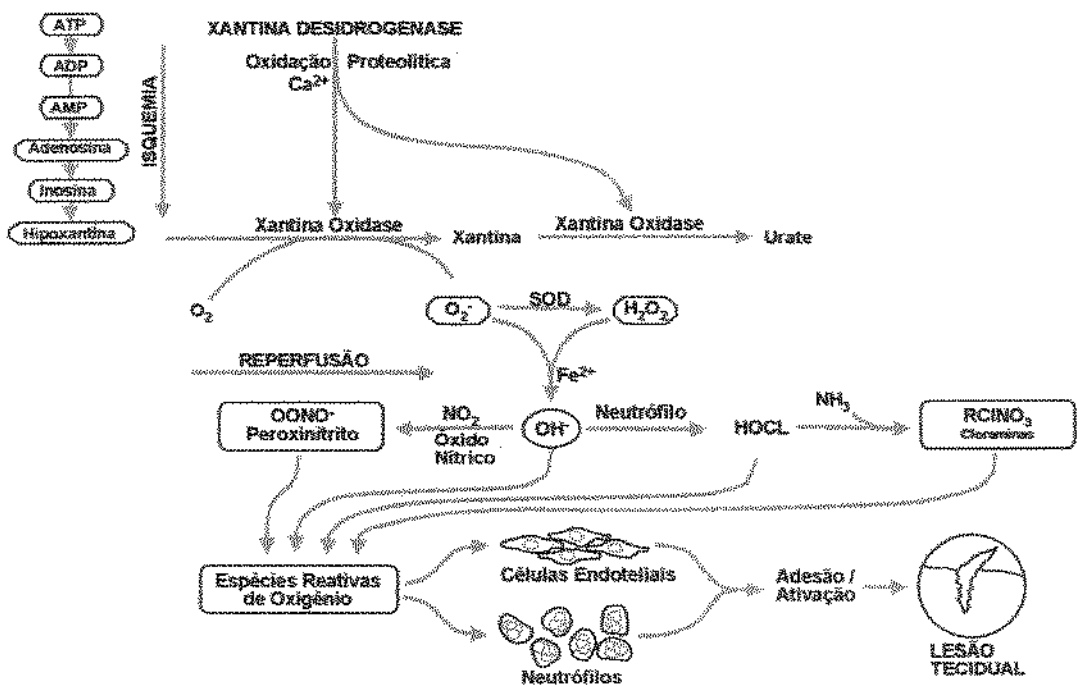


Figura 1- Mecanismos da lesão pós-isquêmica e fontes de ERTO. (Modificado de Rangan e Bulkley, 1993).

A disfunção da microcirculação por lesão de isquemia-reperfusão pode apresentar-se de diferentes maneiras em diferentes órgãos. Os mecanismos propostos para explicar esses fenômenos decorrem tanto da isquemia quanto da reperfusão. Eles incluem fatores que favorecem tanto a obstrução vascular quanto a vasoconstrição, ambas levando ao comprometimento da perfusão tecidual. São fatores envolvidos na obstrução vascular a trombose nos microvasos, a leucostase capilar, o edema da célula endotelial, a hemoconcentração intravascular com aumento da viscosidade sanguínea e o edema intersticial causando compressão de origem extravascular. Os três últimos têm sido implicados em estudos recentes como os principais responsáveis pela deterioração da perfusão capilar pós-isquêmica (Menger, 1995).

Cerca de 90% do sistema vascular do organismo é composto pela microcirculação (Weir et al., 1996). É razoável supor que, nos estados de choque, considerando-o como evento associado à isquemia-reperfusão de todo o organismo, ocorra uma disfunção global da microcirculação secundariamente à lesão endotelial pulmonar. A administração de superóxido dismutase aboliu esse efeito, sugerindo que os radicais superóxido têm um papel relevante na disfunção endotelial. A disfunção generalizada da microcirculação a partir de lesão endotelial parece exercer um papel central na patogenia da Disfunção de Múltiplos Órgãos e Sistemas, que se segue aos quadros de choque (Haglund e Gerdin, 1991; Heard e Fink, 1991).

Tanto a lesão endotelial quanto as alterações da microcirculação mediadas pelas ERTOs podem afetar a utilização de oxigênio dos tecidos. A lesão endotelial determina aumento da permeabilidade capilar levando ao edema intersticial. O edema dificulta a utilização de oxigênio por aumento da distância entre a mitocôndria e o capilar. Simultaneamente ocorre aumento de pressão nos tecidos com compressão de vasos linfáticos e vênulas pós-capilares, fatores que tendem a aumentar o edema intersticial. Tais fatores somados determinam a síndrome de aumento da permeabilidade capilar (*capillary leak syndrome*) (Schumacker e Sansel, 1989).

A diminuição do fluxo sangüíneo capilar na reperfusão, seja devido à vasoconstrição ou à obstrução por adesão de leucócitos ou à agregação plaquetária, leva à má perfusão tecidual, que somada aos edemas endotelial e tissular agrava a utilização de oxigênio pelas células. Estes mecanismos são considerados responsáveis, em parte, pela disfunção de múltiplos órgãos secundária à lesão de isquemia-reperfusão (Cipolle et al., 1993).

Na lesão pós-isquêmica ocorre um desequilíbrio do sistema de controle do tônus vascular em favor da vasoconstrição. Isto acontece através da liberação de endotelina (Tonnessen et al., 1993) e tromboxano e, ao mesmo tempo, da inibição do NO (Engelman et al., 1995) e prostaciclina (Myers et al., 1994). As ERTOS, em especial o radical hidroxila, são, em parte, responsáveis pela inativação do NO.

1.4.2- Em relação aos radicais livres e ao estresse oxidativo

Vários autores têm relatado que existe produção aumentada de ERTOS em diversas doenças humanas, entre elas diabetes melito, câncer, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, aterosclerose, síndrome de isquemia-reperfusão, SARA, artrite reumatóide e no próprio envelhecimento (Halliwell et al., 1992; Ashraf e Zhai, 1995; Frederiks et al., 1995; Garcia-Valdecasas et al., 1995; Oredsson et al., 1995).

As espécies reativas tóxicas do oxigênio (ERTOS), ou radicais livres, são átomos, íons ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados em sua órbita externa, o que os tornam substâncias extremamente instáveis do ponto de vista químico, sempre tendendo a acoplar este elétron não pareado com outro presente em estruturas próximas de sua formação, comportando-se ora como oxidantes (doadores de elétrons) ora como redutores (receptores de elétrons) (McCord, 1965; Dormandy, 1989; Halliwell, 1991; Cheeseman e Slater, 1996).

Muitas vezes é preferível o termo espécie reativa a radical livre, pois algumas destas substâncias não possuem elétrons ímpares não pareados; todavia, sua capacidade oxidante permite classificá-las como espécies reativas do oxigênio (Martinez-Cayuela, 1995).

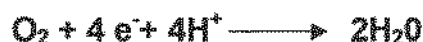
Assim sendo, o termo radical livre não é ideal para designar os agentes reativos patogênicos derivados do oxigênio, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada orbital. Como em sua maioria são derivados do metabolismo de O_2 , no decorrer deste texto será utilizado também o termo "espécies reativas tóxicas do oxigênio" (ERTO) para referir-se a eles (Bast et al., 1991; Ferreira e Matsubara, 1997).

A presença de um elétron não pareado é convencionalmente representada por um ponto na fórmula: $R^\cdot$ (Ferreira e Matsubara, 1997). Caso um radical livre reaja com uma molécula não radical, esta passa a ser um novo radical livre. Ao contrário, se dois radicais livres reagem, ambos dão lugar a espécies químicas não radicais. Esta propriedade química possibilita aos radicais livres participar de milhares de reações químicas em sequência (McCord, 1985).

Dentre os radicais livres destacam-se o átomo de hidrogênio, o íon ferro, o íon cobre e a molécula de oxigênio (O_2), principal representante desta classe. Ao mesmo tempo ocorre a produção de ERTO por auto-oxidação de pequenas moléculas e por atividade de certas enzimas, principalmente neutrofílicas, macrófágicas e monocíticas que têm papel fundamental na atividade bactericida (Parke e Sapota, 1996). Quando este equilíbrio fisiológico é rompido, a produção excessiva de espécies de oxigênio pode levar ao dano tissular.

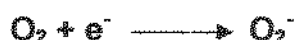
Dois importantes mecanismos levam à produção de espécies reativas do oxigênio. Uma resulta do acúmulo de hipoxantina e da conversão da enzima xantina-desidrogenase para xantina-oxidase durante a anóxia, com degradação da hipoxantina para superóxido após a reoxigenação. O outro mecanismo depende do sistema de oxidação NADPH, que está presente principalmente na superfície da membrana de neutrófilos, monócitos e macrófagos que catalisam a redução de oxigênio para peróxido de hidrogênio e ânion superóxido. A xantina desidrogenase, enzima existente em diversos órgãos como intestino, pulmão, fígado e coração, é importante fonte endógena de hidroxila ($OH^\cdot$). Acredita-se que esta enzima regule a fagocitose no sistema retículo-endotelial (Kelly, 2000).

Os radicais livres formados a partir do oxigênio molecular são responsáveis por muitos dos efeitos biológicos dos radicais. Sob condições normais, o oxigênio molecular é submetido - na mitocôndria, por ação da citocromo-oxidase - a uma redução tetravalente, com quatro elétrons formando duas moléculas de água:

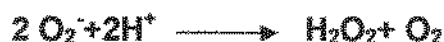


Porém, sua redução incompleta origina diversas espécies reativas (Fridovich, 1970; Werns e Lucchesi, 1990).

Contudo, o oxigênio apresenta uma tendência a aceitar um elétron de cada vez, formando três espécies oxidantes, que são o superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (Kurose e Granger, 1994). A redução univalente do oxigênio forma o radical superóxido:



O radical superóxido, por sua vez, sofre dismutação espontânea ou por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), presente normalmente nas células, formando o peróxido de hidrogênio:



Esta reação é bastante rápida, de tal forma que a produção de superóxido *in vivo* geralmente é acompanhada da produção de peróxido de hidrogênio.

O estresse oxidativo é caracterizado pela formação de espécies oxigênio-reativas como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila. Estas moléculas, em particular o radical hidroxila, são altamente instáveis.

A geração de espécies reativas do oxigênio segue uma verdadeira reação em cadeia, onde substâncias menos tóxicas, como o ânion superóxido, vão formando espécies mais lesivas, como os radicais hidroxila e íon hipocloroso.

As ERTOS formam ligações covalentes irreversíveis com uma série de estruturas celulares, entre elas os lipídeos, ácidos nucleicos e polissacarídeos. Particularmente, a ligação com lipídeos insaturados leva a um processo de peroxidação, com posterior alteração de permeabilidade das membranas e perda de função (Zima et al., 1996). Os ácidos nucleicos têm suas bases nitrogenadas modificadas, possibilitando o fenômeno de mutações gênicas (Goligorsky et al., 1992) e os polissacarídeos, ao reagirem com ERTOS, sofrem despolimerização e conseqüente perda de função (Zima et al., 1996). Por último, é preciso citar as enzimas intracelulares que são inativadas, seja por despolimerização ou desnaturação. Isto explica porque as ERTOS estão envolvidas na fisiopatologia de diversas doenças inflamatórias, infecciosas e neoplásicas nos mais variados sistemas orgânicos - respiratório, cardiovascular, gastrointestinal e cerebral (Cochrane et al., 1983; Del Sodato et al., 1985; Bernier et al., 1986; Klausner et al., 1989; Bayati et al., 1990; Lykens et al., 1992; Nezu et al., 1994; Ashraf e Zhai, 1995; Curello et al., 1995; Frederiks et al., 1995; Garcia-Valdecasas et al., 1995; Oredsson et al., 1995).

As espécies reativas do oxigênio podem ter origem exógena - tabagismo, luz solar, drogas - ou endógena, que é a mais representativa. Diversas são as fontes endógenas de espécies reativas como a cadeia respiratória mitocondrial, retículo endoplasmático, membrana plasmática e células fagocitárias, entre outras (Werns, 1990).

Cerca de 99% do oxigênio corpóreo é metabolizado em água e trifosfato de adenosina (ATP) pela citocromo-oxidase existente na cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias. Menos de 2% deste oxigênio sofre redução univalente, gerando espécies altamente reativas como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila ($OH^\cdot$) (Halliwell e Gutteridge, 1984; Pryor, 1986; Martinez-Cayuela, 1995). Normalmente estas substâncias são neutralizadas por antioxidantes endógenos, porém em certas ocasiões, particularmente em situações de isquemia tecidual, ocorre limitação na redução de O_2 a H_2O pela citocromo oxidase (McCord, 1985).

Embora o superóxido e o peróxido de hidrogênio possam causar dano celular direto, são oxidantes fracos. Contudo, eles servem de substrato para a formação do mais reativo e lesivo dos radicais livres, o radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$). Isto se dá pela reação de Harber-Weiss, que pode ser catalisada pelo ferro ou pelo cobre *in vivo*. O radical hidroxila é extremamente reativo e particularmente citotóxico, reagindo com qualquer componente celular que esteja próximo ao local onde é formado (Zimmerman e Granger, 1994, Ferreira e Matsubara, 1997).

Os ácidos graxos insaturados existentes nas membranas plasmáticas, assim como os aminoácidos oxidáveis, são susceptíveis ao dano celular causado pelas ERTOS (Freeman e Crapo, 1982). Os componentes lipídicos da membrana celular são geralmente as primeiras macromoléculas expostas à ação dos radicais livres, iniciando o processo da peroxidação lipídica (Schiller et al., 1993). A peroxidação lipídica destes ácidos graxos produz o malondialdeído (MDA), um indicador de agressão tissular, assim como os metais de transição existentes nestas membranas podem catalisar a conversão de H_2O_2 e $\text{O}_2^\cdot$ em oxidantes mais potentes (Valenzuela, 1991). Além de ser, por si só, um indicador de peroxidação lipídica, o MDA parece causar polimerização dos componentes das membranas celulares, bem como reagir com bases nitrogenadas, alterando a sequência da molécula de DNA (Martinez-Cayuela, 1995).

Os ácidos graxos poliinsaturados são constituintes da membrana que sofre diretamente a peroxidação. Isto acarreta alterações de permeabilidade e fluidez da membrana plasmática, com eventual lise da célula. Além disso, pode haver ativação da cascata do ácido araquidônico com formação de mediadores inflamatórios. Isto ocorre quando um radical livre, como o ânion $\text{OH}^\cdot$, seqüestra um átomo de hidrogênio ($\text{H}^\cdot$) da molécula de ácido araquidônico, levando à formação de radicais lipídicos como os hidroperóxidos lipídicos ($\text{LOOH}^\cdot$) e dienos conjugados. Essas moléculas iniciam uma reação em cadeia decompondo-se em radicais peroxil e outros compostos, incluindo alquenais, hidroxialquenais e malondialdeído (MDA), também altamente reativos, reagindo com outras moléculas vizinhas e perpetuando o processo de peroxidação lipídica. Dessa forma, a

cascata do ácido araquidônico pode ser deflagrada pela ação de ERTO e pode ela própria ser a fonte de novos radicais. É esta peroxidação lipídica que parece ser o substrato final dos efeitos citotóxicos causados pela ERTO (Defraigne et al., 1994).

A medida da peroxidação lipídica é um método útil para avaliar a lesão induzida por ERTO. Pode-se, por exemplo, avaliar a eficácia de uma intervenção antioxidante determinando sua capacidade de inibir o processo de peroxidação lipídica. Os métodos usados para se obter a peroxidação lipídica incluem medidas diretas ou indiretas de compostos derivados, como os hidroperóxidos lipídicos, dienos conjugados e outros aldeídos, além do MDA (Valenzuela, 1991).

O endotélio vascular também participa da gênese destas espécies reativas através da síntese do óxido nítrico (NO), que é um potente vasodilatador, inibidor da agregação plaquetária e inibidor da aderência de neutrófilos. O NO em contato com o O_2^- origina o peroxinitrito ($ONOOO^-$), espécie altamente tóxica (Barnes e Belvisi, 1993; Gaston et al., 1994; Zapol et al., 1994).

Outras fontes endógenas de espécies reativas de oxigênio são as células inflamatórias, particularmente os neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos (Martinez-Cayuela, 1995). Ao serem requisitadas para realizar a fagocitose estas células tornam-se ativadas, isto é, ocorre um aumento do metabolismo oxidativo celular, conhecido como explosão respiratória, com geração de O_2^- e H_2O_2 , entre outras substâncias oxidativas. Este processo é decorrente de reações que envolvem a NADPH-oxidase, uma enzima localizada na superfície externa da membrana plasmática (Blake et al., 1987).

O próprio organismo possui mecanismos de defesa endógenos, capazes de neutralizar a ação de ERTO. A fim de manter a homeostase fisiológica, o organismo é capaz de anular a ação lesiva das espécies reativas, graças à ação de estruturas conhecidas genericamente como varredores de oxidantes, que exercerão um papel de defesa antioxidante celular (Cotgreave et al., 1988; Cadenas, 1989; Baron et al., 1991; Halliwell et al., 1992; Homans et al., 1992; Rahman e MacNee, 2000).

Os mecanismos incluem desde enzimas que reagem diretamente com os radicais livres até elementos estruturais celulares, como a mitocôndria e o peroxissomo, capazes de compartimentalizar agentes oxidantes como o ferro, envolvidos na formação do radical hidroxila. São três as enzimas com ação específica antioxidante: a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione redutase-peroxidase.

A SOD previne o acúmulo de superóxido e a catalase reduz o peróxido de hidrogênio, ambas, portanto, prevenindo a formação de radical hidroxila pela reação de Harber-Weiss.

A glutathione peroxidase exerce a mesma ação que a catalase, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como doadora de hidrogênio. Os sistemas GSH e GSH-peroxidase promovem a redução de hidroperóxidos a compostos hidroxilados, inibindo dessa forma a propagação da peroxidação lipídica). Em situações fisiológicas há um equilíbrio delicado entre a formação de ERO e os mecanismos endógenos antioxidantes (Schiller et al., 1993, Moslen e Smith, 1995).

Esta situação em que a geração de ERO suplanta a defesa antioxidante é conhecida como estresse oxidativo (Dasgupta et al., 1997). Este estresse oxidativo e, por conseguinte, o aumento na produção de ERO, pode levar a alterações profundas no metabolismo celular, incluindo desarranjo estrutural na molécula de DNA, aumento no conteúdo citossólico de Ca^{+2} , perda na capacidade de transporte iônico transmembrana e peroxidação lipídica de ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, com alteração da permeabilidade da membrana e perda da integridade celular (Del Maestro et al., 1980; Hyslop et al., 1988; Imlay e Linn, 1988).

O estresse oxidativo ocorre quando os mecanismos de defesa antioxidantes não são capazes de neutralizar a formação das ERO. Isto pode ocorrer devido ao excesso de produção de radicais, à diminuição das defesas antioxidantes ou ainda a ambos simultaneamente, como na lesão de reperfusão. Durante a isquemia, a hipóxia promove uma diminuição dos níveis de glutathione, pois a mesma requer nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADP) para sua reconstituição (Waxman, 1996).

A lesão celular produzida pela peroxidação lipídica pode variar desde o aumento da permeabilidade até a lise da célula. A geração de ERTOS intracelular tem estado presente na maioria das células parenquimatosas pulmonares, incluindo células endoteliais, células epiteliais alveolares tipo II, células claras, células do epitélio aéreo ciliado, como também nos macrófagos alveolares (Al Mehdi et al., 1997).

O trabalho de Granger et al., 1986, demonstrou que o maior dano celular ocorre na fase de reperfusão, onde os radicais livres de oxigênio são formados em grande parte e responsáveis pela lesão pós-isquêmica.

■ **Prevenção da formação e isolamento das espécies já formadas**

Como a produção de espécies reativas de oxigênio é contínua, já que depende da respiração celular, prevenir a sua formação torna-se importante na defesa da célula. A diminuição desta formação pode ocorrer nos vários estágios da síntese de espécies reativas (Halliwell e Gutteridge, 1990).

Uma vez que a presença de íons de transição como o ferro funciona como cofator para a síntese de espécies reativas (reações de Haber-Weiss e Fenton), limitar a sua biodisponibilidade é estratégia interessante na diminuição da formação de ERTOS. Substâncias como a hemoglobina, transferrina, lactoferrina e ceruloplasmina englobam o ferro livre extracelular, reduzindo sua ação. A ceruloplasmina catalisa a oxidação dos íons ferroso em férrico. O íon férrico, por sua vez, liga-se à transferrina diminuindo a síntese de hidroxila. Dentro da célula, a ferritina desempenha o principal papel na prevenção da utilização dos íons de transição por ligar-se ao ferro. A pequena porção de ferro que não se encontra ligada à ferritina e, portanto, está disponível para participar das reações redox, sofre a ação de enzimas antioxidantes intracelulares como a catalase e a superóxido dismutase (SOD), que se ligam ao ferro, impedindo a formação de hidroxila (Dormandy, 1978).

Outra fonte geradora de ferro são as células lesadas por inflamação tecidual, que acabam liberando suas reservas ligadas à ferritina; este ferro, em estado iônico, interage com os radicais orgânicos e ânion superóxido liberados por

fagócitos, catalisando a peroxidação lipídica e gerando mais $\text{OH}^\cdot$. Esta ocorrência pode ser limitada através da ação da lactoferrina fagocitária e da transferrina plasmática (Heffner e Repine, 1989).

■ Conversão de espécies reativas tóxicas em menos lesivas

A presença de moléculas com a capacidade de transformar espécies reativas em substâncias inativas constitui um dos principais mecanismos de defesa contra a agressão tissular por radicais livres. Este tipo de defesa inclui uma variedade de compostos, distintos entre si pelo anel químico que desenvolve a ação protetora. Estas substâncias são chamadas de varredores celulares, tornando-se o principal sistema de que as células dispõem durante o chamado estresse oxidativo. Este sistema está presente tanto no compartimento intra quanto extracelular, funcionando através da eliminação das substâncias tóxicas ou prevenindo sua conversão. Os varredores antioxidantes podem ser divididos em categorias, a saber, as enzimas antioxidantes, as substâncias lipossolúveis e as substâncias hidrossolúveis (Hennekens et al., 1994).

Já que as defesas antioxidantes podem agir de forma sinérgica e, muitas vezes não é possível determinar qual é a substância exata que desempenha esta ação de varredura, torna-se importante a quantificação da capacidade antioxidante total ou *status* antioxidante total (SAT) de determinado fluido, valor que indica a capacidade do sistema em antagonizar o estresse oxidativo. Vários componentes agem como antioxidantes para neutralizar as ERTs, compondo este *status* antioxidante. Entre eles o ácido ascórbico, ácido úrico, α -tocoferol, β -caroteno e a albumina, cujo grupo $-\text{SH}$ (sulfidril) reage com os radicais peróxil (Halliwell e Gutteridge 1990; Riemersma et al., 1991; Boosalis et al. 1996).

Cada uma destas substâncias consideradas antioxidantes possui uma habilidade própria em neutralizar determinada espécie reativa. Uma deficiência de qualquer um destes componentes causa redução no SAT. Portanto, torna-se mais útil e economicamente rentável dosar a capacidade antioxidante total utilizando um ensaio único do que medir cada uma das substâncias antioxidantes individualmente

(Sharpe et al., 1996). Em contrapartida, valores diminutos do SAT podem indicar situações em que a lesão é determinada por aumento na produção de espécies reativas (Mulholland e Strain, 1991; Gey et al., 1993).

■ Enzimas antioxidantes

As enzimas antioxidantes compõem o principal grupo de varredores intracelulares. Seu mecanismo de ação ocorre fundamentalmente através da eliminação do ânion superóxido e dos hidroperóxidos, que podem oxidar substratos celulares. Dentre as enzimas antioxidantes destacam-se a glutathiona, a SOD e a catalase (Halliwell e Gutteridge, 1990; Halliwell et al., 1992).

O maior sistema de proteção endógeno das células contra os prejuízos provocados por substâncias oxidantes é o da glutathiona reduzida/oxidada. A glutathiona age sobre os hidroperóxidos, os produtos da peroxidação lipídica e os produtos de reações catalisadas pela lipoxigenase. Um aumento em sua atividade parece ser um sinal característico de adaptação ao estresse oxidativo (Belsten e Wright, 1995).

A glutathiona peroxidase (GSH-Px) é a enzima responsável pela redução dos hidroperóxidos. Esta enzima localiza-se preferencialmente no citossol das células eucarióticas, apesar de menores concentrações serem encontradas nas mitocôndrias. Possui quatro átomos de selênio, é relativamente resistente à inativação pela hidroxila e pelo ânion superóxido e usa como substrato a glutathiona reduzida para formar a glutathiona oxidada (Paglia e Valentine, 1967).

Outra enzima que pertence à classe de varredores antioxidantes é o superóxido dismutase (SOD). Este sistema enzimático parece ser específico para o ânion superóxido, constituindo-se na segunda linha de defesa, após a participação da glutathiona peroxidase contra a agressão dos radicais livres (Belsten e Wright, 1995).

A catalase é uma hemoproteína que catalisa dismutação do peróxido de hidrogênio. Localiza-se preferencialmente nos peroxissomos hepáticos eritrocitários, sendo pouco encontrada em células cerebrais, musculares, pancreáticas ou pulmonares (Blake et al., 1987).

■ Antioxidantes lipossolúveis

Os principais antioxidantes lipossolúveis são a vitamina E e o β -caroteno. A vitamina E ou α -tocoferol (α -TH) constitui-se na principal defesa contra o dano oxidativo às membranas celulares. Sua função é converter o ânion superóxido, os radicais hidroxila e os radicais peroxilipídicos em formas menos ativas, através da doação de um íon hidrogênio (Burton et al., 1982).

A vitamina E parece exercer, ainda, inibição à migração e quimiotaxia neutrofílica (Di Mascio et al., 1991). Apesar de amplamente difundida pelo organismo, a vitamina E tem atividade prevalentemente sobre a membrana celular, sendo ineficiente sua capacidade de prevenir a peroxidação lipídica no plasma (Ingold et al., 1987).

O β -caroteno é um precursor da vitamina A e atinge altas concentrações nas membranas de certos tecidos. Parece ser um varredor específico do oxigênio *singlet*, reagindo diretamente com radicais peróxido (Gey et al., 1993). Exerce ação sinérgica juntamente com a vitamina E; porém, enquanto o β -caroteno age em baixas pressões parciais de oxigênio, o α -tocoferol age em altas pressões (Di Mascio et al., 1991).

■ Antioxidantes hidrossolúveis

O principal antioxidante hidrossolúvel é a vitamina C, presente tanto no meio extra quanto intracelular (Mulholland e Strain, 1993). Seu papel é varrer diretamente os radicais superóxido e hidroxila, levando à formação de um composto intermediário que é reduzido pela GSH. Em doses dependentes, a vitamina C parece ser capaz de reduzir Fe^{+++} em Fe^{++} (Gey et al., 1993). No plasma humano sua concentração normal varia entre 50 e 200 μ M, sendo capaz de regenerar o α -tocoferol através da redução de seus radicais nas superfícies de membranas (Di Mascio et al., 1991).

Outro antioxidante hidrossolúvel é o ácido úrico, um metabólito das purinas, que varre diretamente o oxigênio *singlet*, $\text{OH}^\cdot$ e o $\text{O}_2^\cdot$, além de prevenir a oxidação da vitamina C (Miller et al., 1993).

■ Métodos de detecção das ERTO

A detecção das ERTO *in vivo* é tecnicamente difícil devido à sua extrema reatividade e vida média muito curta - cerca de milissegundos ou menos. No entanto, a mensuração dos produtos da peroxidação lipídica, principalmente o malondialdeído, é usada para estimar a lesão da peroxidação *in vivo*. O aumento nos produtos da peroxidação lipídica tem sido documentado em várias doenças humanas, incluindo artrite reumatóide, esclerose múltipla, hepatopatias, síndrome de Down, transplante de órgãos e doenças pulmonares, entre elas a síndrome do desconforto respiratório aguda (Halliwell e Gutteridge, 1984).

As ERTO podem ser avaliadas de forma direta ou indireta. Dentre estes métodos para a detecção destacam-se a espectrofotometria de ressonância eletrônica de *spin* (ESR), o *spin trap* e a quimioluminescência (Gutteridge, 1986; Gutteridge e Halliwell, 1990).

Pode-se afirmar que as reações entre macromoléculas biológicas e espécies reativas de oxigênio são um dos principais mecanismos que explicam a lesão tecidual (Lissi et al., 1995). Para haver agressão tissular por ERTO é preciso que ocorra hiperoxigenação, síndrome de isquemia-reperfusão ou inflamação tecidual. Estas situações aumentam o metabolismo aeróbico dos leucócitos polimorfonucleares em até dez vezes, levando ao aumento na produção de ERTO, particularmente do radical hidroxila (Mulholland e Strain, 1990; Pattanaik e Prasad, 1996).

Os danos celulares, vasculares e teciduais por isquemia e reperfusão têm sempre um componente isquêmico e outro de reperfusão que se somam ou se amplificam mutuamente. Para que uma determinada intervenção antioxidante atenuar ou previna a lesão de reperfusão, é condição fundamental que as ERTO geradas predominantemente na reperfusão sejam de fato as principais responsáveis. Ou

seja, que a lesão pós-isquêmica se deva, em sua maior parte, ao estresse oxidativo e não à lesão *per se*. Assim, a depender do tempo de duração da isquemia, o tratamento específico de componentes lesivos da reperfusão pode ou não ser tão leve a ponto de tomar a terapia da lesão de reperfusão sem efeito. Por outro lado, períodos muito longos de isquemia podem levar à lesão tecidual extensa, unicamente pelo processo isquêmico, obscurecendo o componente lesivo da reperfusão. Então, o conceito de janela terapêutica pode ser entendido como o período em que a maior parte da lesão pós-isquêmica é causada por fatores gerados na reperfusão e, portanto, passíveis de prevenção ou tratamento (Schiller et al., 1993), Figura 2.

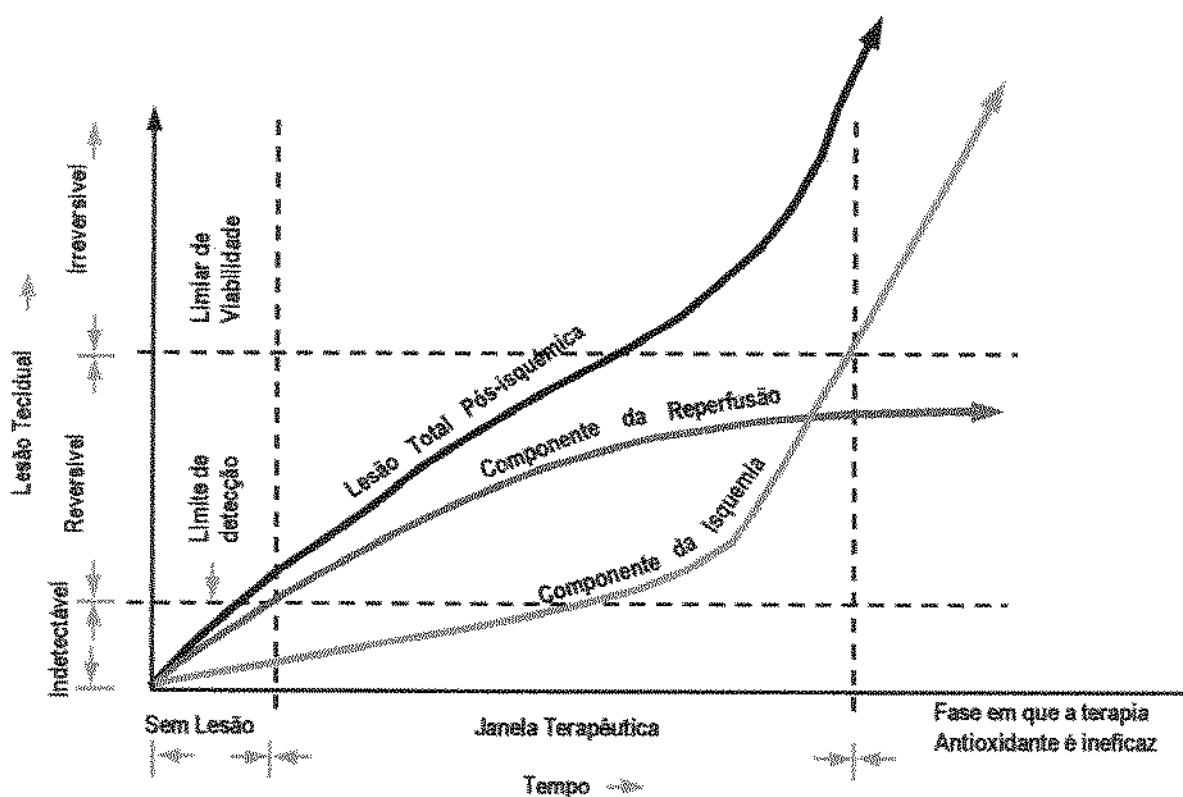


Figura 2- Conceito teórico da janela terapêutica modificado de Schiller et al, 1993)

1.5- Resposta inflamatória na isquemia e reperfusão pulmonar

1.5.1- Em relação ao macrófagos alveolares

Os macrófagos alveolares apresentam habilidade de secretar radicais livres derivados do oxigênio, do nitrogênio e citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), que se tem mostrado como elemento central de uma variedade de modelos de lesão pulmonar aguda (Naidu et al., 2004). Este autor demonstrou que o macrófago alveolar é uma importante fonte de mediadores inflamatórios como o TNF- α , que afeta primeiramente o endotélio, epitélio e células intersticiais e favorece o recrutamento de células inflamatórias e o eventual desenvolvimento da lesão tissular.

O envolvimento dos macrófagos alveolares através da ativação do NF-kappa B na produção do TNF- α está fortemente comprovado (Lentsch et al., 1999).

Maxey et al., em 2004, demonstraram que o TNF- α das células pulmonares residentes são o fator-chave inicial na lesão I/R. Esse autor considera que a fonte deste TNF- α não está muito bem estabelecida, mas provavelmente seria originada dos macrófagos residentes. Estes achados têm grande implicação clínica nas áreas de transplante pulmonar e cirurgia com circulação extracorpórea, indicando que a terapia com anti-TNF- α , diretamente no pulmão doador antes do transplante, pode significativamente reduzir a lesão aguda I/R, que é observada em muitos pacientes pós-operatórios.

O envolvimento de células pulmonares residentes, como os macrófagos, contudo, não está completamente compreendida e pode ter uma maior participação do que se acreditava anteriormente na IRP (Eppinger et al., 1997). Em adição, os receptores expressos na superfície dos macrófagos permitem também agir como células-alvo de citocinas.

Eppinger et al., em 1997, demonstraram que os macrófagos estão envolvidos na fase precoce da lesão de reperfusão pulmonar. Nesse estudo, os mediadores químicos de lesão de reperfusão em ratos foram bem caracterizados, onde

o TNF- α e o interferon-gamma - fatores bem conhecidos na atividade respiratória e em outras funções inflamatórias dos macrófagos - foram estudados. A lesão precoce de reperfusão está amplamente determinada pela atividade macrofágica, ao passo que a lesão tardia é mediada principalmente pelos produtos de neutrófilos ativados e recrutados.

Na fase precoce da I/R, a secreção de TNF- α é localizada nos macrófagos alveolares. Fiser e colaboradores em 2001b descreveram a natureza bifásica da injúria de reperfusão após o transplante pulmonar, iniciando com os macrófagos residentes do doador, seguida de uma resposta mais intensa dos neutrófilos circulantes do receptor. Os neutrófilos também têm sido reconhecidos como componentes críticos da cascata inflamatória.

1.5.2- Em relação à ativação neutrofílica

Embora o sistema inflamatório participe na lesão de reperfusão após o transplante pulmonar, o tempo e o envolvimento exato dos componentes celulares não estão bem esclarecidos. Os neutrófilos polimorfonucleares, especificamente, têm sido reconhecidos como componentes críticos da cascata inflamatória, mas seu envolvimento na patofisiologia da lesão de reperfusão é uma fonte de controvérsias. Evidências de que os neutrófilos possuem grande envolvimento na reperfusão são demonstradas em estudos utilizando depleção leucocitária e em estudos com anticorpos direcionados contra moléculas de adesão nos leucócitos e células endoteliais (Breda et al., 1985; Eppinger et al., 1995; Uthoff et al., 1995; Novick e Gehman, 1996; Eppinger et al., 1997; Ross et al., 1999).

Um dos primeiros mecanismos pelos quais os neutrófilos causam lesão é através da liberação de metabólitos tóxicos do oxigênio, como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio. Todos esses podem lesar o endotélio pulmonar direta ou indiretamente (Novick e Gehman, 1996). A elastase e outras proteases, que são produtos neutrófilos-granulócitos, podem também lesar

diretamente o endotélio pulmonar e as células parenquimatosas. Finalmente, o terceiro método pelos quais os neutrófilos podem causar ou contribuir para a lesão de reperfusão é o tamponamento dos capilares. Os neutrófilos ativados tornam-se menos deformáveis e podem ficar permanentemente aprisionados nos capilares alveolares (Welbourn et al., 1991, Kuhnle et al., 1998).

Em trabalhos experimentais publicados anteriormente, a injúria vascular tem sido naturalmente bifásica (Eppinger et al., 1995). Embora a fase tardia seja dependente do recrutamento e ativação neutrofílica, a fase precoce é neutrófilo-independente e ocorre em 15 minutos de reperfusão. A lesão precoce acontece bem antes que a infiltração neutrofílica tissular tenha ocorrido, e é dependente de células residentes do tipo macrófago alveolar. Eppinger et al., em 1995, demonstraram em estudo *in vivo* que a depleção neutrofílica não tem efeito protetor após 30 minutos de reperfusão, mas pode atenuar a lesão após quatro horas. Estes achados sugerem que o envolvimento neutrofílico na reperfusão ocorre durante a fase tardia da reperfusão e que outros mecanismos ou células são responsáveis pelo dano tissular na fase precoce.

Os neutrófilos contêm em sua membrana plasmática uma enzima, a nicotinamida difosfato de adenosina (NADPH) oxidase, que reduz o O_2 de maneira univalente formando os radicais O_2^- e H_2O_2 . Além disso, quando ativados, os neutrófilos secretam a MPO que catalisa a formação de ácido hipocloroso (HOCl) a partir do peróxido de hidrogênio e íon cloreto:



O HOCl é um potente agente oxidante e cerca de 100 vezes mais reativo que o H_2O_2 . Pode mediar a citotoxicidade diretamente pela oxidação de grupos sulfidril, inativação de proteínas e degradação de aminoácidos, ou indiretamente via ativação de proteases. Estas propriedades conferem aos neutrófilos sua ação bactericida, porém, no caso de tecidos pós-isquêmicos, são

responsáveis por boa parte da lesão tecidual que se instala durante o período de reperfusão. Vários modelos experimentais demonstraram ativação neutrofílica em tecidos pós-isquêmicos. Observou-se que a isquemia resulta em aumento significativo na atividade da enzima mieloperoxidase neutrofílica, que é exacerbado pela reperfusão (Kurose e Granger, 1994; Zimmerman e Granger, 1994).

Muitos trabalhos na literatura descrevem técnicas visando atenuar a lesão de isquemia e reperfusão; entretanto, pequena atenção é dada aos mecanismos específicos da injúria propriamente dita (Maxey et al., 2004). Evidências sugerem que neutrófilos circulantes participam da lesão causada pela isquemia e reperfusão, onde foram utilizadas técnicas de depleção leucocitária (Ross, 1999).

Em contraste, outros autores demonstraram que lesão significativa de reperfusão pode ocorrer sem a participação neutrofílica, e que os neutrófilos podem não ter efeito na fase precoce do dano pulmonar de reperfusão (Deeb et al., 1990; Steimle et al., 1992).

O sistema complemento também tem sido implicado tanto na formação de complexos que atacam as membranas celulares como na geração de C5a, que pode contribuir para a lesão pulmonar (Riedemann e Ward, 2003).

1.5.3- Em relação as interleucinas

A resposta inflamatória levando à disfunção e falência de um órgão é o maior problema após a ocorrência de lesões em diferentes condições clínicas, como sepse, queimaduras graves, pancreatite aguda, choque hemorrágico, trauma e transplantes (Bathia e Moochhala, 2004).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória em resposta a uma variedade de processos patológicos. Alguns autores demonstraram que o TNF- α compromete a barreira endotelial, produzindo edema pulmonar experimental (Hocking et al., 1990; Koga et al., 1995).

O TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias são detectados no fluido do lavado broncoalveolar obtido a partir de pacientes com SARA (Strieter et al., 1989), elevando também a resistência vascular pulmonar, o que resulta em edema alveolar devido à liberação de tromboxano A₂ em resposta à ativação de leucócitos polimorfonucleares (Hocking et al., 1990).

Em resposta ao estresse oxidante *in vitro*, os macrófagos alveolares secretam TNF- α . Ao TNF- α é atribuído o potencial de liberação de citocinas, aumento da permeabilidade vascular pulmonar e modulação do eventual recrutamento e ativação de neutrófilos - células efetoras acreditadas à mediação da injúria de reperfusão tardia (Van Otteren et al., 1995).

Existem fortes evidências de que o TNF- α seja um fator desencadeante do processo de isquemia e reperfusão, e participa da patofisiologia de pulmões submetidos a diferentes modelos inflamatórios e choques endotoxêmicos (Eppinger et al., 1997).

O TNF- α pode funcionar como citocina inicial na complexa cascata inflamatória da lesão de isquemia e reperfusão pulmonar. No entanto, tornou-se difícil focalizar os componentes individuais nesta complexa cascata (Bathia e Moochhala, 2004).

As células pulmonares, em particular as células epiteliais alveolares do tipo II, são susceptíveis aos efeitos da injúria dos oxidantes. Isto comprova que as células pulmonares liberam mediadores inflamatórios e citocinas, como o TNF- α , IL-1 e IL-8 em resposta ao estresse oxidativo /nitrosativo (Fubini e Hubbard, 2003).

O TNF- α é uma citocina reconhecida como um importante mediador dos eventos inflamatórios nos pulmões, derivada predominantemente de monócitos e macrófagos ativados e age por meio de receptores específicos da membrana celular. A injeção de TNF- α em animais de experimentação causa uma síndrome que é indistinguível ao choque séptico. Seus níveis circulantes são elevados em um número de condições que levam ao choque, e atualmente é um dos mediadores mais relacionados à falência circulatória na sepse (Cohen, 2002).

Similarmente, a IL-1 β ativa neutrófilos e induz a ligação das moléculas de adesão aos leucócitos e ao endotélio, causando um estado similar ao choque em animais de experimentação. Originalmente descrita como molécula da febre, ela identifica um portfólio de genes usualmente não expressos em indivíduos saudáveis. Por exemplo, a IL-1 β induz a ciclooxigenase (COX-2) e a expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Ela também eleva a expressão de outras citocinas tal como o TNF- α , IL-6 e as moléculas de adesão (Okusawa et al., 1988; Putensen e Wrigge, 2000).

Durante a sepse, TNF- α e IL-1 β são liberados nos primeiros 30 a 90 minutos após a exposição ao lipopolissacarídeo e convertidos para o segundo nível da cascata inflamatória, incluindo citocinas, mediadores lipídicos, ERTO, como também a ativação de moléculas de adesão que resultam na iniciação da migração de células inflamatórias para os tecidos (Cohen, 2002).

O TNF- α , identificado como agente inflamatório a partir de 1986, pode induzir a mudanças inflamatórias crônicas associadas com um aumento na variedade de mecanismos de defesa, incluindo os antioxidantes, sendo também um importante mediador inflamatório no DPOC e na SARA, e está presente em níveis aumentados no fluido do lavado broncoalveolar e no escarro dos pacientes com DPOC (Keating et al., 1996).

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina antiinflamatória (Fiorentino et al., 1991; Kasama et al., 1994). Os níveis plasmáticos estão elevados em modelos animais de endotoxemia e inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias - como IL-1 β , IL-6, TNF- α - a partir de monócitos e macrófagos, prevenindo assim o subsequente dano tissular (Howard et al., 1992; Van der Poll et al., 1997). A IL-10 também estimula a produção da IL-1ra e a liberação do receptor de TNF p75 solúvel, desse modo neutralizando a ação pró-inflamatória dessas citocinas (Seitz et al., 1995).

A IL-10 tem sido mostrada inibindo a produção de macrófagos alveolares ativados por mediadores pró-inflamatórios envolvidos na SARA (Lo et al., 1998).

Em estudos clínicos envolvendo pacientes de SARA de diferentes etiologias - sepse, politraumatizados e perfuração intestinal - obteve-se que pacientes com SARA demonstraram níveis menores de IL-10 circulante e no lavado broncoalveolar, além de elevação dos níveis de TNF- α (Bathia e Mochhala, 2004).

O estudo de Armstrong e Milla em 1997, salientou a potencial importância do desequilíbrio das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias na SARA, que pode ser refletida pela relação IL-10 e TNF- α nos pulmões. Em outro estudo, a deficiente resposta da IL-10 contribuiu para a evolução para sepse em queimados (Yeh et al., 2002). A administração de IL-10 tem efeito protetor em modelos animais de diferentes etiologias, como sepse e pancreatite (Kusske et al., 1996; Inoue, 2000).

A presença do estresse oxidativo no espaço aéreo e no sangue inicia uma sequência de eventos precoces durante o processo inflamatório pulmonar. As células inflamatórias são sequestradas na microcirculação pulmonar e recrutadas na via aérea, resultando na geração de mediadores como IL-8. Uma vez recrutadas, as células inflamatórias tornam-se ativadas gerando espécies reativas.

A resposta inflamatória pode ser ativada de diferentes formas. A primeira é o envolvimento dos macrófagos pulmonares residentes na lesão precoce, em que a ativação destas células desencadeia a cascata inflamatória através da liberação de TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias. Na reperfusão, a injúria celular leva novamente à ativação dos macrófagos residentes, liberando então mais mediadores inflamatórios. Ao final, as citocinas estimulam a ativação dos neutrófilos e células T. A cascata inflamatória amplifica em uma resposta sistêmica, com maior influxo sobre o órgão injuriado. De fato, a resposta é suficientemente exagerada, podendo provocar lesões em outros órgãos, incluindo o coração e o pulmão contralateral. Uma visão global deste processo prevê múltiplas células e moléculas-alvo para manipulação (Reece et al., 2005).

A exagerada e, muitas vezes, descontrolada resposta inflamatória na sepse e no trauma resulta em morbidade e mortalidade, onde as citocinas podem aumentar muitas vezes e diminuir quando os fatores desencadeantes estão controlados (Brun-Buisson, 2000).

1.6- O exercício físico e suas alterações na resposta inflamatória

Estudos transversais demonstraram uma associação entre inatividade física e inflamação sistêmica de baixo grau em sujeitos saudáveis (Smith et al., 1999; Mattusch et al., 2000; Fallon et al., 2001; Geffken et al., 2001; Abramson e Vaccarino, 2002; Wannamethee et al., 2002; King et al., 2003), como também em pacientes com claudicação intermitente (Tisi et al., 1997).

O conceito de inflamação sistêmica crônica de baixo grau foi introduzido em condições onde as concentrações sistêmicas de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-1ra, e PCR estão elevadas duas ou três vezes. O estímulo para esta produção não é bem conhecido, mas assume-se que a origem da produção de TNF- α na inflamação sistêmica crônica de baixo grau seja no tecido adiposo (Coppack, 2001).

A inflamação crônica de baixo grau é refletida pelo aumento da concentração da proteína C reativa e aumento dos níveis de algumas citocinas (Ross et al., 1999) que acompanham o envelhecimento, como também algumas desordens médicas crônicas. Durante o envelhecimento, os níveis séricos de TNF- α (Paolisso et al., 1998; Bruunsgaard et al., 1999; Dobbs et al., 1999; Bruunsgaard, 2005) IL6, IL-1ra (Dobbs et al., 1999) e CRP (Ballou et al., 1996) estão elevados.

O envolvimento da atividade física na saúde cardiovascular tem recebido muita atenção nos últimos anos. O exercício físico regular exerce proteção principalmente contra a aterosclerose, diabetes tipo 2, cânceres colorretal e mamário (Blair et al., 2001). Em adição, o treinamento físico é efetivo no tratamento de pacientes com doença miocárdica isquêmica, insuficiência cardíaca

e DPOC. Em geral, populações bem treinadas têm maior capacidade de difusão pulmonar comparadas às não treinadas (Petersen e Pedersen, 2005).

Recentes estudos demonstraram o envolvimento da inflamação na patogênese da aterosclerose (Libby et al., 2002; Libby, 2002) e tem sido sugerido como elemento-chave na resistência à insulina no diabetes (Dandona et al., 2004).

Fatores que podem modular a resposta auto-imune durante a atividade física incluem mudanças nos níveis circulantes de várias citocinas, alterações no estado nutricional, uma expressão alterada das moléculas adesivas e uma possível intervenção nas ERT (Shepard e Shek, 1998).

Enquanto a manifestação de muitas alterações imunes relacionadas ao exercício têm sido repetidamente relatadas e confirmadas, os mecanismos fundamentais desencadeantes e moduladores da resposta imune são pobremente conhecidos (Evans, 1986).

Estudos experimentais têm confirmado que tanto períodos curtos como longos de exercício físico promovem proteção miocárdica em ratos submetidos à isquemia e reperfusão (Bersohn e Scheuer, 1978; Bowles et al., 1992; Bowles e Starnes, 1994; Demirel et al., 1998; 2001; Libonati et al., 1997; Powers et al., 1998; Lennon et al., 2004). Especificamente, períodos curtos de exercício, isto é, de um a cinco períodos de exercícios de resistência reduzem o dano cardíaco e promovem a recuperação miocárdica (Powers et al., 1998; Demirel et al., 2001). Embora o mecanismo bioquímico exato responsável por esta proteção não seja bem conhecido, postula-se que as mudanças induzidas no miocárdio podem resultar da elevação de defesas antioxidantes e/ou níveis cardíacos de *heat shock protein* (HSP) (Powers et al., 1998; Demirel et al., 2001).

A resposta das citocinas ao exercício agudo difere daquela vista nas infecções graves (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Pedersen et al., 2001; Febbraio e Pedersen, 2002; Suzuki et al., 2002). Nota-se que as clássicas citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL1 β , em geral não se elevam com o exercício,

indicando que a cascata de citocinas induzidas pelo exercício marcadamente difere da cascata induzida pelas infecções. Tipicamente, IL-6 é a primeira citocina presente na circulação durante o exercício. O nível de IL-6 circulante aumenta exponencialmente - acima de 100 vezes - na resposta ao exercício extenuante e declina no período pós-esforço (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Pedersen et al., 2001; Febbraio e Pedersen, 2002; Suzuki et al., 2002).

Outro achado em relação ao exercício é o aumento dos níveis das citocinas antiinflamatórias e citocinas inibidoras, como IL-1ra e sTNF-R (Ostrowski et al., 1999; 2000). Em conjunto, o exercício provoca um aumento primário na IL-6, seguido de um aumento na IL-1ra e IL-10.

A elevação acentuada da IL-6 ao exercício sem dano muscular tem sido um achado consistentemente encontrado (Northoff et al., 1994; Drenth et al., 1995; Castell et al., 1997; Hellsten et al., 1997; Ostrowski et al., 1999; 2000; 2001). A expressão do aumento sérico está relacionada à intensidade do exercício, duração, à massa do músculo recrutado e à capacidade de tolerância individual (Febbraio e Pedersen, 2002; Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Pedersen et al., 2001).

Alguns estudos demonstram que os monócitos não são as células que mais contribuem para a resposta da IL-6 no exercício (Moldoveanu et al., 2000; Starkie et al., 2001). Outras fontes de produção e liberação de IL-6 após o exercício podem ser a partir do tecido adiposo (Lyngso et al., 2002), cérebro (Nybo et al., 2002) e tecidos peritendinosos (Langberg et al., 2002).

O aparecimento de IL-10 e IL-1ra na circulação após o exercício também contribui na mediação dos efeitos antiinflamatórios do exercício. O conceito de que IL-10 age como uma molécula antiinflamatória foi sugerida primariamente por estudos mostrando a inibição da síntese de amplo espectro de citocinas pró-inflamatórias por diferentes células, particularmente nas linhagens monocíticas. Desta forma, a IL-10 inibe a produção de IL-1 α , IL-1 β e TNF- α como também a produção de quimoquinas, incluindo IL-8 e macrófagos inflamatórios

ativados por monócitos humanos ativados por LPS (Moore et al., 1993; Pretolani, 1999).

Estas citocinas e quimoquinas apresentam um importante envolvimento na ativação de granulócitos, monócitos, macrófagos, linfócitos B e T e seu recrutamento nos sítios inflamatórios. Estas observações sugerem que a IL-10 apresenta um importante envolvimento em orquestrar a reação inflamatória, que envolve a ativação de macrófagos/monócitos em particular.

O exercício físico regular protege o indivíduo contra doenças associadas com a inflamação crônica de baixo grau (Bruunsgaard, 2005). Este efeito, a longo prazo, pode ser atribuído à resposta antiinflamatória obtida pelo ataque agudo do exercício, que é particularmente mediado pela IL-6 derivada dos músculos. Concentrações fisiológicas de IL-6 estimulam o aparecimento na circulação de citocinas antiinflamatórias IL-1ra e IL-10 e inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α . Além disso, a IL-6 estimula a lipólise como também a oxidação gordurosa. Após o exercício, os níveis elevados circulantes de IL-6 são seguidos por uma redução de IL-1ra e IL-10, e tardiamente estas duas citocinas antiinflamatórias podem ser induzidas pela IL-6 (Steensberg et al., 2003).

O estudo da lesão de isquemia-reperfusão pulmonar, notadamente da resposta inflamatória, é de grande importância para a melhor compreensão da fisiopatologia de diversas situações na prática clínica diária.

Levando em consideração as fortes evidências que o exercício físico tem demonstrado, tanto na prevenção quanto na reabilitação de inúmeras doenças que atuam sobremaneira no componente inflamatório, o presente trabalho visa estudar os efeitos do exercício físico dinâmico - condicionamento físico - na resposta inflamatória do dano causado pela isquemia e perfusão pulmonar normotérmica em ratos.

2- OBJETIVOS

Serão objetos deste trabalho as análises:

- do índice de permeabilidade vascular nos pulmões direito e esquerdo, expressas em conjunto e individualmente.
- do nível de atividade da mieloperoxidase nos pulmões direito e esquerdo, expressas em conjunto e individualmente.
- dos níveis séricos de TNF- α .
- dos níveis séricos de IL-1 β .
- dos níveis séricos de IL-10.

3- SUJEITOS E MÉTODO

Os experimentos foram realizados em ratos no Laboratório de Pesquisa em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. A temperatura ambiente, nos dias dos experimentos, variou entre 20 a 32 graus Celsius.

3.1- Animais de experimentação

Foram utilizados ratos machos Wistar, com peso de 350 a 450 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp. Os experimentos foram realizados de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação” da União Internacional Protetora dos Animais e da Lei 6638, de maio de 1979, e submetidos à apreciação e aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa Experimental Animal CEEA-IB-Unicamp, sob o protocolo número 746-1, conforme anexos.

3.1.1- Grupos experimentais

Neste estudo foram utilizados três grupos experimentais:

- Grupo *SHAM* (n=10): os animais não foram incluídos no programa de exercício físico, mas foram submetidos aos mesmos procedimentos operatórios, com exceção do protocolo de isquemia e reperfusão pulmonar.
- Grupo *IR/SED* (n=10): os animais foram excluídos do programa de treinamento de exercício físico, mas foram submetidos ao protocolo de isquemia e reperfusão pulmonar.
- Grupo *IR/TREIN* (n=10): os animais foram submetidos ao programa de treinamento de exercício físico e ao protocolo de isquemia e reperfusão pulmonar.

Com os resultados das análises laboratoriais, foram comparados os animais dos grupos *sham*, treinado e sedentário.

3.2- Procedimento experimental

3.2.1- Programa de exercício físico dinâmico

As sessões de exercício físico foram realizadas em esteira ergométrica elétrica, em baias individuais, com as seguintes dimensões: 0,70m de largura, 0,45m de altura e 1,35m de comprimento, conforme Figura 3. Na primeira semana de estudo, os animais passaram por um período de adaptação à esteira, onde a atividade física teve início com velocidade de 0,6 km/h na primeira sessão, aumentando progressivamente até atingir a velocidade de 1,2 km/h durante 60 minutos. Isto corresponde a 66% da VO_{2max} , de acordo com o experimento de Priviero et al em 2001. Passada a semana de adaptação, o programa de corrida em esteira foi realizado cinco dias por semana, em sessões de 60 minutos, durante oito semanas. Após o término do período total de treinamento, os animais foram mantidos em repouso por um período de 48 horas, quando então foram submetidos ao procedimento operatório.



Figura 3- Esteira ergométrica elétrica dividida em baias com animais em treinamento.

3.2.2- Procedimento operatório

Todo os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnolol, 35mg/kg, i.p.) e traqueostomizados com a introdução de um cateter 14F através de uma incisão mediana no pescoço e fixos com sutura de algodão 2-0, e ventilados com respirador a pressão Inter 3 (Intermed®- Brasil) com FiO₂ 60%, frequência respiratória de 80 movimentos por minuto, com pressão expiratória final de 2cm H₂O e pressão-limite de 10cm H₂O (Farivar et al., 2004), conforme Figura 4. Após dissecação da veia femoral direita esta foi utilizada para a manutenção da anestesia com solução de pentobarbital sódico (15mg/ml) i.v baseada nos níveis da resposta reflexa, conforme *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals* (Wixson e Smiler, 1997). O controle do plano anestesiológico utilizou parâmetros de monitoração através de reflexos - córneo, auricular e digital - com infusão anestésica conforme a avaliação dos reflexos durante o procedimento verificado a cada 15 minutos (Kohn et al., 1997). Manteve-se o controle de hidratação do animal com infusão de 3 mL/hora de solução salina 0,9%. Todos os animais foram operados sobre uma mesa térmica - manta térmica -, conforme Figura 5, controlada através das temperaturas retal e dorsal (entre o dorso do animal e a manta térmica) e mantidas entre 36,8 a 37,4 graus Celsius. Após toracotomia para-esternal esquerda, com ampliação antero-lateral homolateral, todos os animais receberam 100 U.I. heparina i.v. em *bolus*, e em seguida a injeção da albumina marcada com I¹²⁵. A partir deste momento somente os grupos sedentário e treinado foram submetidos à mobilização do pulmão esquerdo atraumaticamente e a artéria pulmonar esquerda, veias pulmonares esquerda e brônquio esquerdo foram clampeados sem compressão violenta ao término da insuflação. Após 90 minutos de isquemia, o clampe foi retirado e os pulmões foram ventilados e reperfundidos por um período de duas horas. Durante todo o tempo do experimento as incisões foram cobertas com gaze úmida de solução salina para minimizar perdas evaporativas. Após o término do período de reperfusão, os animais receberam uma dose de pentobarbital de 1,5mg e foram desconectados da ventilação mecânica para o sacrifício. Em seguida, após laparotomia mediana, amostras de sangue foram coletadas da aorta abdominal, conforme Figura 6 e os pulmões foram perfundidos com 50mL de

solução salina 0,9% a partir de uma altura de 20cm via artéria pulmonar, através de uma incisão do ventrículo direito e canulação da artéria pulmonar, seguida de abertura do átrio esquerdo para drenagem do efluente. Após a perfusão com solução salina, os pulmões foram retirados e, separadamente, o pulmão direito e o esquerdo foram submetidos à análise da resposta inflamatória através do índice de permeabilidade vascular, atividade de mieloperoxidase, dosagem dos níveis séricos de TNF- α , IL-1 β e IL-10, conforme descrição metodológica.

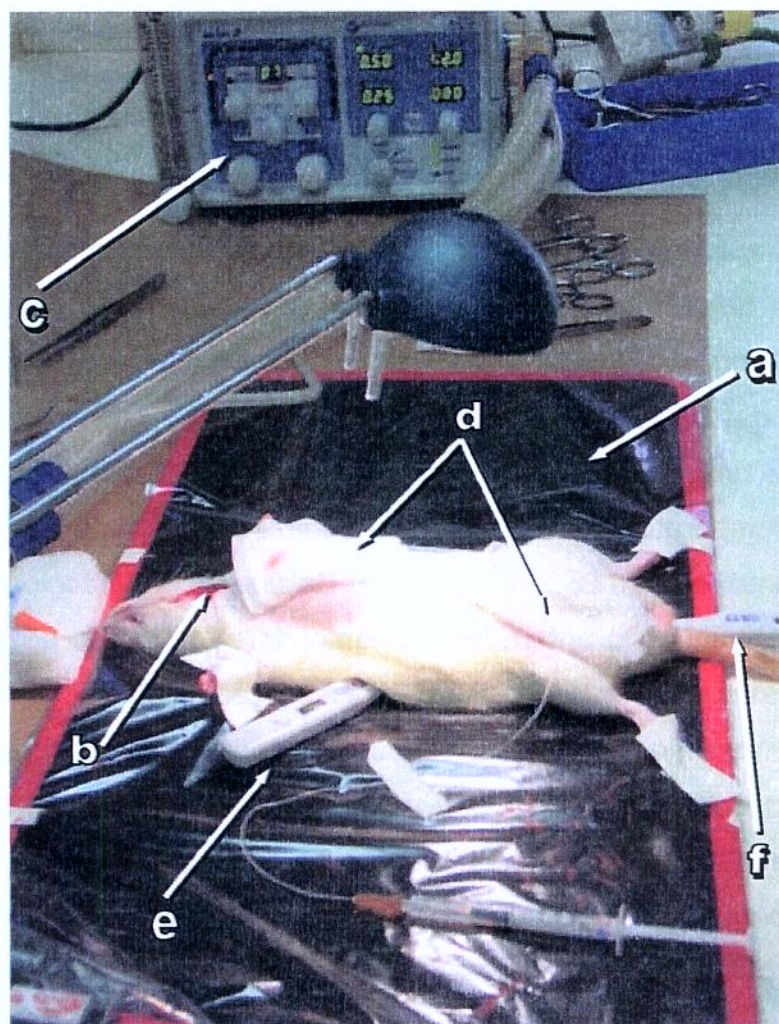


Figura 4- Visão geral do set experimental evidenciando-se a manta térmica (a), via de acesso para assistência ventilatória (b), ventilador mecânico (c), feridas cobertas com gazes umedecidas (d) e controles térmicos de bancada (e) e corpóreo (f).



Figura 5- Rato em procedimento operatório, no momento do clampeamento arterial pulmonar, mostrando a canulação venosa femoral direita e os controles térmicos retal e de bancada.

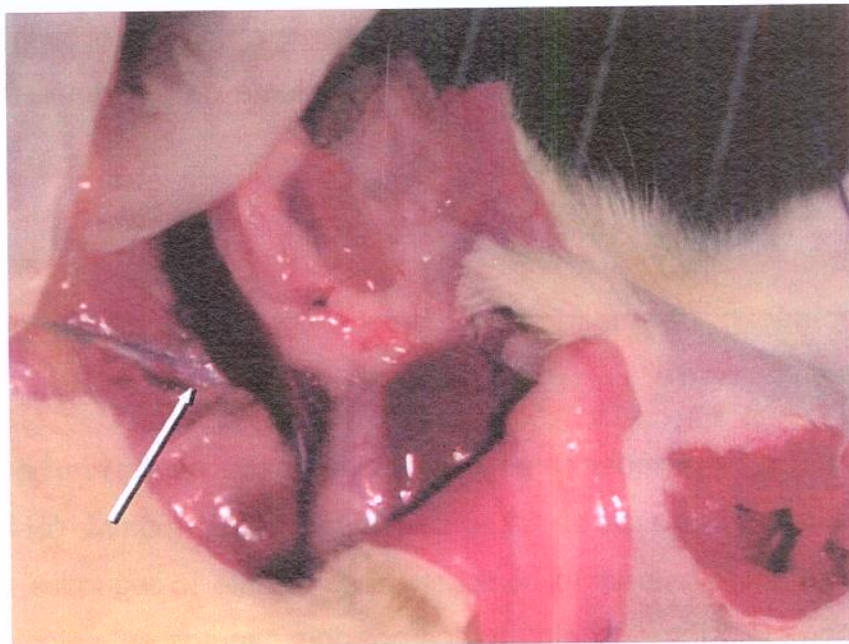


Figura 6- Rato submetido à laparotomia após o sacrifício, evidenciando-se a punção da aorta abdominal, conforme a seta.

3.3- Determinação do número de leucócitos circulantes

Amostras de sangue foram colhidas no momento da dissecação venosa para o experimento, a fim de proceder à contagem total dos leucócitos que foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se 10µl de sangue obtidos da veia caudal antes do procedimento operatório, diluídos em 200µl de solução Turk. A análise diferencial dos leucócitos foi determinada em microscópio óptico (lente de imersão) pela contagem de 300 células em esfregaços de sangue corados com Diff Quick, diferenciando-se os neutrófilos, eosinófilos e mononucleares. Os resultados das contagens, total e diferencial, dos leucócitos foram expressos como número de células por mililitro de sangue.

3.4- Índice da permeabilidade vascular nos pulmões direito e esquerdo

A quantidade de edema pulmonar foi avaliada em função do acúmulo local de albumina bovina marcada com I^{125} (2,5µCi/kg), previamente administrada via endovenosa depois de atingido o plano anestésico adequado. A radioatividade presente nas amostras de sangue e tecido pulmonar foi quantificada em contador gama. O edema formado foi expresso como volume de plasma extravasado em função da contagem obtida em 1ml de plasma.

3.5- Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO) nos pulmões direito e esquerdo

Ambos os pulmões foram cortados em pedaços de 1cm³ e mantidos em tubos de testes na presença de 100µl de tampão fosfato (50mM, pH 6,0, contendo 0,5% de HTAB). Cada amostra foi homogeneizada durante 15 segundos, e alíquotas de 1ml do homogenato foram centrifugadas por dois minutos em velocidade máxima em centrífuga de Eppendorf. Os sobrenadantes obtidos foram submetidos à análise da atividade da MPO. Em uma placa de ELISA, 10µl de sobrenadante foram

adicionados a 200µl de solução de dihidroclorato de o-dianisidina (0,167 mg/ml preparada em tampão fosfato de potássio 50mM contendo 0,005% de H₂O₂). As alterações nos valores de absorbância a 460nm foram registrados em intervalos de 30seg durante cinco minutos. A atividade da MPO foi expressa como unidades de MPO (UMPO)/mg de tecido. Uma UMPO foi definida como a quantidade da enzima que degrada 1µmol de peróxido/min à 25°C (Bradley et al., 1982).

3.6- Determinação de citocinas séricas

As concentrações de IL-1 β , IL-10 e TNF- α foram determinadas no soro dos animais dos grupos treinados, sedentários e *sham*, através de *kits* industrializados, segundo as instruções do fabricante (Pharmigen, EUA).

Os dados foram expressos como médias +/- erro padrão das médias para "n" experimentos. Para a comparação entre os grupos experimentais foi empregada análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Dunnett ou teste de Duncan (*software* US Graphpad Instat, 1990). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4- RESULTADOS

4.1- Peso corpóreo

A avaliação do peso corpóreo dos animais mostrou redução significativa ($p < 0,05$) no grupo IR/TREIN quando comparado ao grupo IR/SED (Gráfico 1).

4.2- Número de leucócitos circulantes

Não foram observadas diferenças significativas no número total de leucócitos circulantes entre os grupos IR/SED e IR/TREIN, apesar de haver uma tendência ao aumento desse número nos animais treinados, que se reflete principalmente no aumento do número de células mononucleares (Gráfico 2).

4.3- Índice de permeabilidade vascular

Quando os dois pulmões dos grupos IR/SED e IR/TREIN são submetidos ao protocolo de isquemia e reperfusão observa-se aumento do índice de permeabilidade vascular, quando comparados ao grupo *sham* ($p < 0,05$). Adicionalmente, o grupo IR/TREIN demonstrou redução significativa do índice de permeabilidade vascular quando comparado ao grupo IR/SED ($p < 0,05$), (Gráfico 3a). No entanto, a redução da permeabilidade observada nos animais submetidos a exercício físico foi significativa ($p < 0,05$) apenas quando analisado o pulmão direito, conforme Gráfico 3b.

4.4- Infiltrado de neutrófilos nos pulmões (atividade da mieloperoxidase)

A análise do infiltrado de neutrófilos foi realizada através da dosagem da atividade de mieloperoxidase nos pulmões direito e esquerdo dos três grupos. Nos pulmões dos animais dos grupos IR/SED e IR/TREIN foram observados valores aumentados de atividade dessa enzima ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo *sham*, assim como as análises são expressas em conjunto, conforme Gráfico 4^a, como

quando expressas isoladamente. Não houve diferença estatística quando comparamos os grupos IR/TREIN e IR/SED, bem como quando as análises foram feitas em conjunto ou isoladamente, de acordo com os Gráficos 4 a e b.

4.5- Níveis de citocinas séricas

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais nos níveis séricos de IL-10. Entretanto, os níveis detectados da IL-1 β no soro dos animais dos grupos IR/SED e IR/TREIN encontraram-se aumentados quando comparados com os do grupo SHAM ($p<0,05$). No grupo IR/TREIN houve redução desses níveis ($p<0,05$), os quais não foram estatisticamente diferentes do grupo SHAM, segundo o Gráfico 5.

Os níveis séricos de TNF- α dos grupos IR/SED e IR/TREIN encontraram-se significativamente aumentados quando comparados ao grupo SHAM. Observou-se redução significativa ($p<0,05$) dos níveis séricos desta citocina no grupo IR/TREIN quando comparados aos do grupo IR/SED.

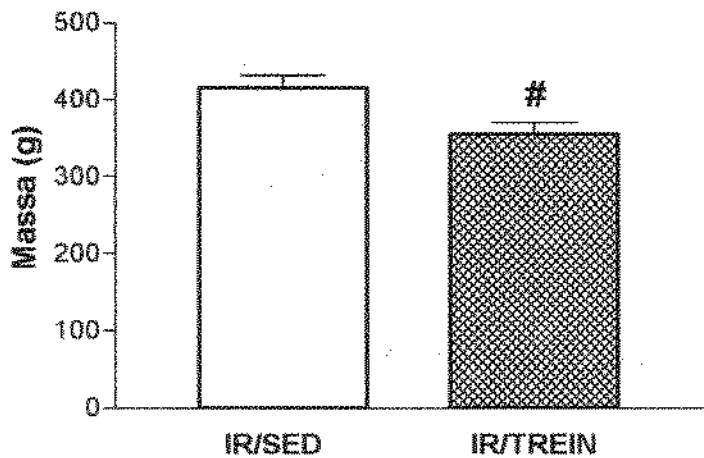


Gráfico 1- Efeito do treinamento físico sobre a massa corpórea dos animais.

As massas corpóreas dos grupos sedentário (IR/SED) e treinado (IR/TREIN) foram avaliadas antes do protocolo de isquemia e reperfusão e expressas em gramas # $p<0,05$.

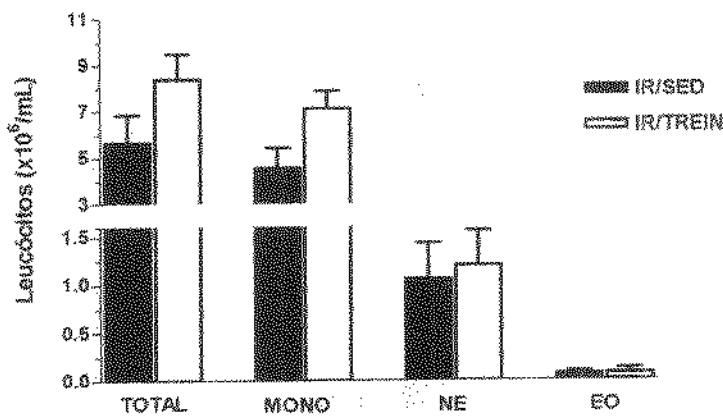
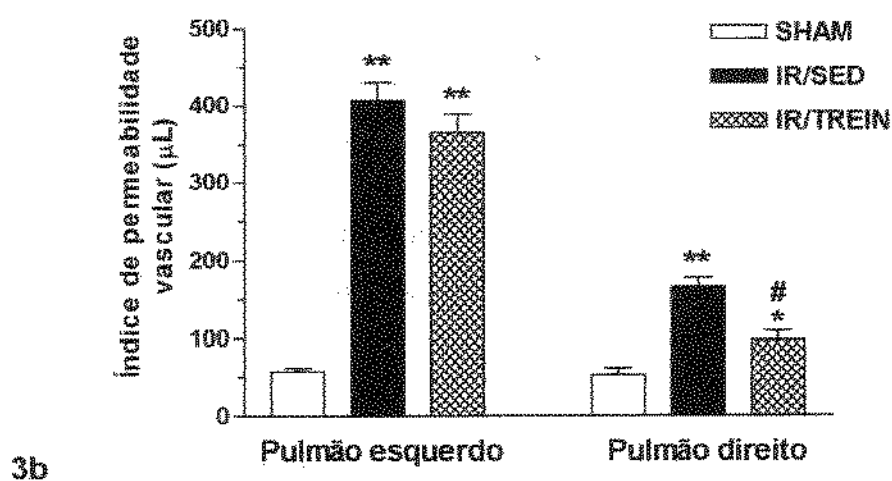
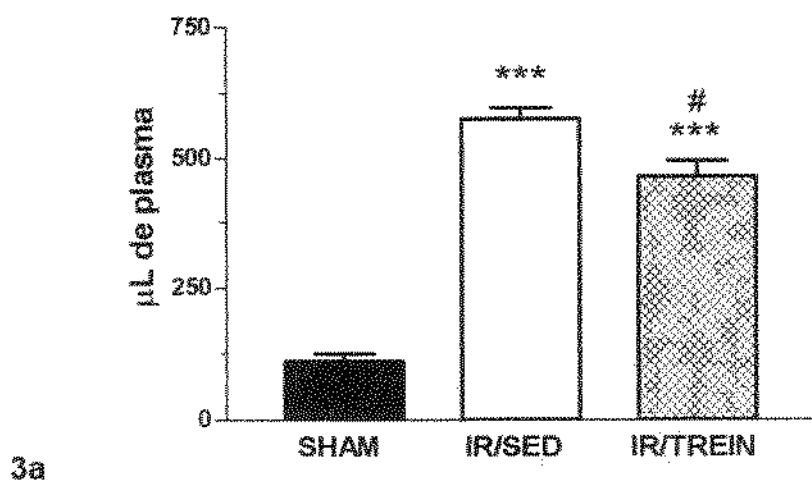


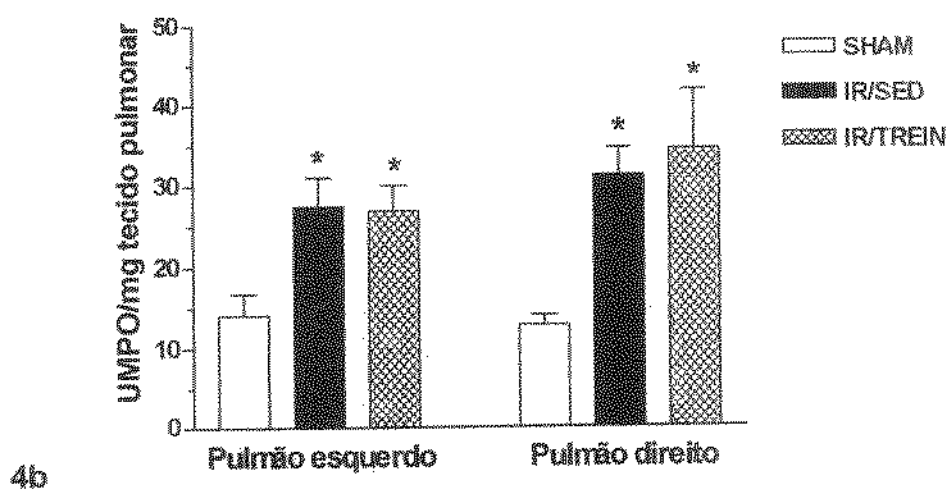
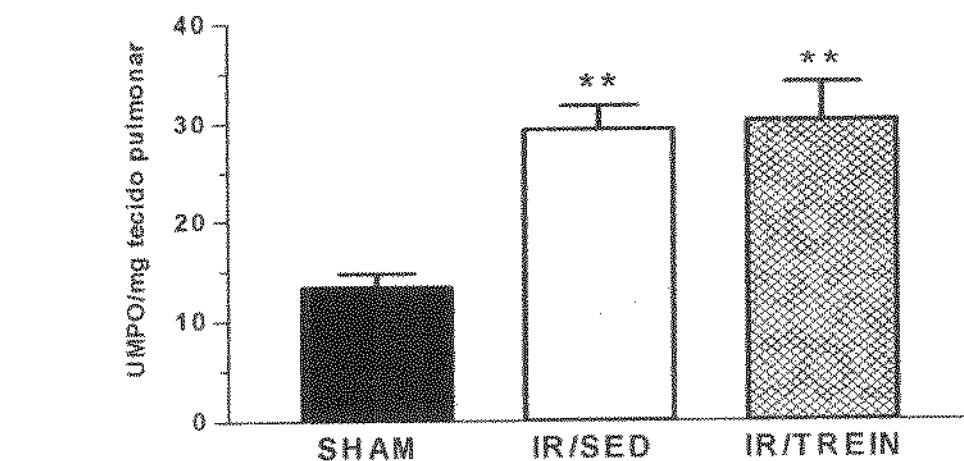
Gráfico 2- Efeito do treinamento físico sobre o número de leucócitos circulantes em ratos sedentários (IR/SED) e treinados (IR/TREIN).

Os números de leucócitos totais, de mononucleares (MONO), neutrófilos (NE) e eosinófilos (EO) foram avaliados antes do protocolo de isquemia e reperfusão. Os valores foram expressos em números de células por mililitro de sangue.



Gráficos 3a e 3b- Efeito do treinamento físico sobre o índice de extravasamento vascular pulmonar em animais submetidos à isquemia e reperfusão, sendo a figura a analisados em conjunto e figura b isolados.

O índice de extravasamento vascular pulmonar foi avaliado em animais dos grupos *SHAM*, *IR/SED* e *IR/TREIN* e expresso como μL de plasma extravasado no tecido pulmonar. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo *SHAM*; # $p < 0,05$ comparado ao grupo *IR/SED*.



Gráficos 4a e 4b- Efeito do treinamento físico sobre o infiltrado de neutrófilos nos pulmões de animais submetidos à isquemia e reperfusão.

O infiltrado de neutrófilos foi avaliado em função da atividade de mieloperoxidase (MPO) pulmonar em animais dos grupos SHAM, IR/SED e IR/TREIN e expressa como UMPO/mg de tecido pulmonar. ** $p < 0,01$ comparado ao grupo SHAM, * $p < 0,01$ quando comparado ao grupo sham.

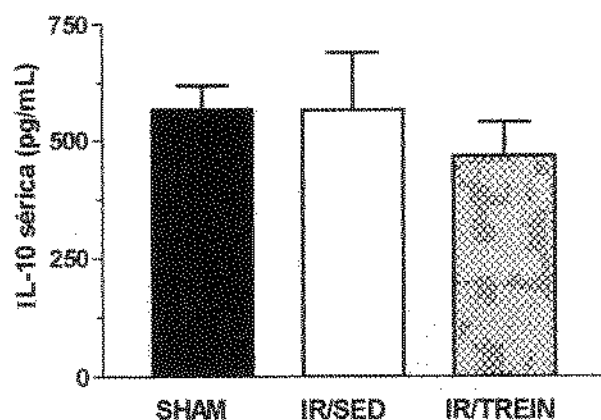
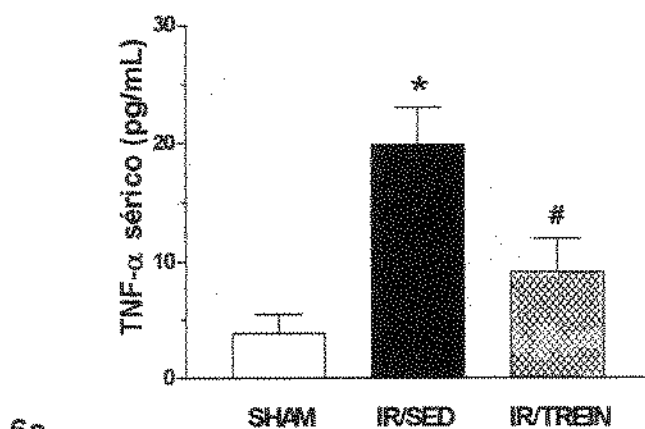
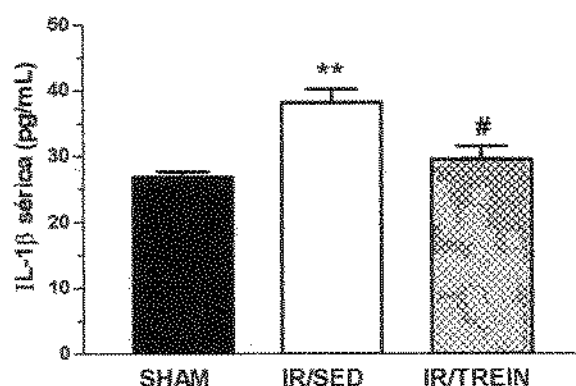


Gráfico 5- Efeito do treinamento físico sobre os níveis séricos de citocinas em animais submetidos à isquemia e reperfusão.

Os níveis séricos de IL-10 foram avaliados em animais dos grupos *SHAM*, *IR/SED* e *IR/TREIN* e expressos como picogramas de cada citocina/mL de sangue.



6a



6b

Gráficos 6a e 6b- Efeito do treinamento físico sobre os níveis séricos de TNF-α e IL-1β em animais submetidos à isquemia e reperfusão pulmonar.

Os níveis séricos de TNF- α e IL-1 β foram avaliados em animais dos grupos *SHAM*, IR/SED e IR/TREIN e expressos como picogramas de TNF- α e IL-1 β /mL de sangue. ** p<0,01 comparado ao grupo *SHAM*; # p<0,05 comparado ao grupo IR/SED; * p<0,01 comparado ao grupo *sham*.

5- DISCUSSÃO

A lesão de isquemia-reperfusão pulmonar constitui evento fisiopatológico comum a numerosas situações na prática clínica. Os efeitos locais e sistêmicos dessa lesão podem ser estudados em condições que envolvem o pinçamento da artéria pulmonar, em procedimentos que empregam a circulação extracorpórea, no tromboembolismo pulmonar e transplante de pulmão; incluímos ainda o pneumotórax total e o derrame pleural volumoso, pois estas doenças podem evoluir com lesão de reperfusão durante o tratamento no momento da reexpansão pulmonar (Esme et al., 2006).

A resposta inflamatória causada pela IRP é, sem dúvida, um dos principais elementos nas alterações causadas pela isquemia e reperfusão, como em situações clínicas e experimentais (de Perrot et al., 2003).

Estudos anteriores mostraram que doenças cardiovasculares e outras condições patológicas têm sido reduzidas ou prevenidas pelo exercício físico regular em humanos e animais (Ostrowski et al., 1999; Boule et al., 2001; Lennon et al., 2004; Priviero et al., 2004; Ding et al., 2005; Kasapis e Thompson, 2005; Petersen e Pedersen, 2005), notadamente onde a resposta inflamatória faz-se presente aguda e cronicamente.

Atualmente, não há estudos clínicos ou experimentais investigando os efeitos do exercício físico na IRP.

Para tanto, desenvolvemos um modelo experimental em ratos com o intuito de avaliar a influência de um programa de treinamento em corrida sobre esteira elétrica no índice de permeabilidade vascular, nos níveis de interleucinas TNF- α , IL-1 β , IL-10 e no influxo neutrofílico causado pela IRP.

5.1- Modelo experimental

Vários fatores podem influenciar as repercussões fisiopatológicas decorrentes da IRP em experimentos, em que se destacam a espécie utilizada - homem, cão, porco, coelho, rato -, manuseios anestésico e operatório, o tempo de isquemia, o tempo de reperfusão, a temperatura do indivíduo e o condicionamento realizado.

O animal escolhido para este experimento foi o rato, pois observamos na literatura a ampla utilização desta espécie para modelos envolvendo a IRP (Eppinger et al., 1995; Khimenko et al., 1998; Krishnadasan et al., 2003; Naidu et al., 2003; Farivar et al., 2004; Krishnadasan et al., 2004), como nos modelos que estudam o condicionamento físico (Bersohn e Scheuer, 1978; Bowles e Starnes, 1994; Powers et al., 1998; Lennon et al., 2004; Priviero et al., 2004; Ding et al., 2005).

Esta espécie animal teve boa aceitação neste protocolo devido ao prático condicionamento, manutenção e reprodutibilidade experimental, compatíveis com os objetivos deste trabalho.

Neste modelo experimental buscamos reproduzir no rato as alterações isquêmicas e de reperfusão pulmonares normotérmicas, e algumas de suas repercussões metabólicas e inflamatórias conseqüentes ao clampeamento do hilo pulmonar esquerdo.

Em relação à logística, houve dificuldade na obtenção de um aparelho de ventilação mecânica que correspondesse às necessidades do experimento, ou seja, ventilar um animal de pequeno porte, com pressão inspiratória constante, pressão expiratória final positiva e volume corrente constante. Após tentativas com aparelhos experimentais importados, uma fabricante brasileira – Intermed®, São Paulo, Brasil - pôde ceder um aparelho do Modelo Inter 3, utilizado em neonatos humanos, que após pequenos ajustes mostrou-se um equipamento seguro e confiável para este experimento.

Outro elemento que consideramos importante para o melhor controle dos fenômenos decorrentes do processo isquemia-reperfusão seriam as medidas de pH e gases arteriais nos momentos inicial e de reperfusão, o que não foi possível por indisponibilidade logística no momento deste experimento.

A toracotomia utilizada foi a médio-esternal esquerda, associada à ampliação lateral ao nível do quinto espaço intercostal. Com esta combinação na abertura do tórax e a utilização de um afastador auto-estático foi possível ampla visualização da cavidade e manipulação dos órgãos intratorácicos.

Para o pinçamento da artéria pulmonar foi empregado clampe vascular atraumático, utilizado para dissecação de acesso venoso durante implantes de marcapasso cardíaco, onde foi possível aplicar a técnica com manipulação digital suave. Após a secção do ligamento pulmonar, obtivemos acesso com ampla visão de todo o hilo pulmonar esquerdo, sendo possível realizar um clampeamento sem aplicação de atitudes traumáticas indesejáveis ao pequeno e delicado pulmão desta espécie, o que poderia interferir na resposta inflamatória.

O tempo isquêmico de uma hora e 30 minutos e o de reperfusão de duas horas utilizados neste trabalho, foram embasados em resultados preliminares de outros autores, onde a permeabilidade microvascular em tempos diferentes de reperfusão (*time course*) após 90 minutos de isquemia foi aumentando acentuadamente durante as primeiras duas horas de reperfusão até atingir o *plateau* após quatro horas (Ito et al., 2004). Os níveis de interleucinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 também apresentam boa expressão a partir de duas horas de reperfusão (Chang et al., 1997; Farivar et al., 2004). Apesar de necessitar de um período de reperfusão mais prolongado (> 4 horas) para atingir o pico de concentração do TNF- α sérico e dos tecidos, nos períodos iniciais de reperfusão a literatura já identifica elevações significativas destas interleucinas (de Perrot et al., 2001; Krishnadasan et al., 2003).

Em relação à infiltração neutrofílica, Eppinger et al., em 1995 e Van Putte et al., em 2005, mostram o primeiro pico de elevação e infiltração neutrofílica aos 30 minutos de reperfusão. No entanto, diferem quanto ao segundo pico, sendo quatro horas no estudo de Eppinger e três horas no trabalho de Van Putte.

No estudo de Esme et al., em 2006, avaliando o estresse oxidativo em tecidos de órgãos a distância, estes autores utilizaram no pulmão o tempo de isquemia de 60 minutos e reperfusão de duas horas, onde foram analisados a infiltração neutrofílica, o *status* antioxidante e os índices de peroxidação lipídica e protéica no fígado e no coração.

Para atingir os objetivos deste estudo não houve qualquer intervenção visando corrigir ou minimizar as alterações impostas pelo modelo *per se*. Assim, foram realizados durante o procedimento a reposição volêmica padrão (3 mL/h de solução salina 0,9%), o controle termostático do colchão térmico, a fim de manter a temperatura retal do animal entre 36 e 36,5 graus Celsius, e a manutenção da infusão anestésica. O controle do plano anestesiológico, conforme preconizado por Kohn et al., em 1997, foi realizado utilizando parâmetros de monitoração através de reflexos - córneo, auricular e digital - verificados a cada 15 minutos durante o procedimento. Pudemos, então, conduzir os experimentos com maior controle biológico e menor índice de mortalidade. Mesmo assim, quatro animais foram a óbito no grupo treinado e um animal no grupo sedentário. Consideramos este número elevado no grupo treinado. No entanto, a taxa de mortalidade neste período foi menor quando comparada ao período anterior à utilização deste controle anestésico, que superava 50%. A principal causa de óbitos pode ser atribuída principalmente aos níveis tóxicos de drogas anestésicas, mais evidentes quando não se alcança o plano anestésico adequado desde o início do procedimento. Foi no período de reperfusão que ocorreu o maior número de óbitos neste modelo, pudemos também na prática constatar que houve neste período a ocorrência do maior número de eventos fisiopatológicos com repercussão local e sistêmica, manifestando-se através de intensa taquicardia, taquipnéia e dificuldade de manutenção do nível anestésico.

As alterações acima, decorrentes do despinçamento, foram observadas em até cinco minutos após a desocclusão da artéria pulmonar, sugerindo a participação de um efeito mecânico ou de algum tipo de reflexo no período imediato após o despinçamento. Isso pode ter ocorrido devido à redistribuição do volume sanguíneo circulante, onde o tônus vascular pode encontrar-se alterado por ação da hipóxia, da acidose metabólica e possivelmente através de mediadores inflamatórios.

Em nenhum momento foi utilizada suplementação na fração inspirada de oxigênio ou modificado o modo de ventilação mecânica, de forma a não provocar alterações na evolução durante os períodos de isquemia e reperfusão.

Pudemos observar significativa diferença no Índice de massa corpórea (IMC) entre os animais sedentários e treinados, como mostra o Gráfico 1. Foi nítida a diferença física entre os animais dos dois grupos. Foram notadas maior tonificação muscular e menor taxa de tecido adiposo nos animais treinados. Repetidas sessões de exercícios produzem adaptações conhecidas como “efeitos do treinamento”. Estes efeitos referem-se a alterações anatômicas, bioquímicas e fisiológicas que diferem significativamente daquelas condições vistas nos espécimes sedentários. Estas condições permitem ao investigador identificar claramente uma adaptação (Scheuer e Tipton, 1977).

5.2- Repercussões da isquemia pulmonar

Os pulmões possuem três fontes potenciais de oxigenação: artéria pulmonar, artérias brônquicas e ventilação alveolar.

A relativa contribuição de cada uma delas na oferta de oxigenação para manter a viabilidade pulmonar, inclusive durante a IRP, não está bem esclarecida (Calvin et al., 2006).

Um estudo experimental em cães mostrou que a depleção da oxigenação pulmonar conseqüente da interrupção da perfusão da artéria pulmonar ou pela ventilação alveolar resulta em grau similar de disfunção pulmonar, em termos de elevação da permeabilidade capilar e resistência vascular pulmonar (Allison et al., 1990). Além disso, a manutenção da ventilação alveolar com oxigênio em isquemia quente (oclusão da artéria pulmonar) atenua a elevação da permeabilidade pulmonar e do edema pulmonar, sugerindo que a oxigenação direta a partir da ventilação alveolar pode ser fator importante na prevenção da isquemia pulmonar (Jones et al., 1997). A ventilação pulmonar com oxigênio durante a preservação pulmonar no transplante pode também proteger os pulmões da lesão isquêmica pela manutenção do metabolismo aeróbico, preservando a surfactante pulmonar e a integridade do transporte epitelial (de Perrot et al., 2003).

A manutenção da perfusão arterial brônquica (sem perfusão arterial pulmonar ou ventilação alveolar) no pulmão isquêmico pode também atenuar a elevação na RVP e limitar o edema após a reperfusão. Interessante é a preservação da função pulmonar ser mais efetiva sobre elevadas perfusões da artéria brônquica do que sobre baixas perfusões (Pearse e Wagner, 1994).

As evidências sugerem que deficiências em uma dessas fontes de oxigenação do tecido pulmonar, artéria pulmonar, artéria brônquica e ventilação alveolar, podem ter importante repercussão na disfunção pulmonar após a IRP (Calvin et al., 2006).

A interrupção do fluxo sanguíneo no pulmão, ao contrário da isquemia em outros órgãos, não é acompanhada de hipóxia desde que a ventilação esteja mantida, exceção feita ao transplante de pulmão, onde ocorre a secção brônquica. Neste modelo experimental realizamos pinçamento de todo o hilo esquerdo, deixando o pulmão parcialmente insuflado, permitindo assim a presença de um resíduo aéreo com alto teor de oxigênio. O oxigênio alveolar serve como substrato para o parênquima pulmonar. Em experimentos com pulmão isolado de rato, demonstraram que a isquemia pulmonar *per se* resulta em peroxidação lipídica em decorrência da presença de O₂ a partir da ventilação alveolar. O uso de nitrogênio, em vez de O₂, na composição do gás utilizado na ventilação pulmonar inibiu a peroxidação lipídica (PL). A PL durante a isquemia pulmonar é agravada pela reperfusão e presença de ferro (Fisher et al., 1991; Zhao et al., 1997).

De forma convincente, Atochina et al., em 1997, demonstraram também que a oxigenação do tecido pulmonar pode ocorrer através da vasculatura pulmonar ou por difusão de oxigênio alveolar. Portanto, a isquemia pulmonar não necessariamente leva à anóxia tissular, e a reperfusão não significa reoxigenação caso a ventilação seja mantida durante o período de isquemia. Clinicamente, este princípio é aplicado durante a circulação extracorpórea a fim de minimizar a lesão de reperfusão, porque a ventilação do tecido pulmonar é mantida, apesar da parada cardiorrespiratória.

Durante a isquemia, componentes da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria são reduzidos, aumentando o escape de elétrons. Além disso, mesmo com a interrupção do fluxo sanguíneo sempre persiste uma quantidade de O₂ residual nos tecidos isquêmicos, capaz de reagir com elétrons e de formar radicais superóxidos (Ferrari et al., 1991).

Mesmo em condições fisiológicas existe a produção contínua de radical superóxido, decorrente do escape de elétrons da cadeia respiratória na mitocôndria, correspondente de 3% a 5% do O₂ molecular. As ERTOs, assim formadas, são rapidamente neutralizadas pelos mecanismos endógenos de defesa antioxidante (Flaherty, 1991).

A lesão induzida pela IRP é caracterizada por dano alveolar inespecífico, edema pulmonar e hipoxemia, ocorrendo dentro de 72 horas após transplante pulmonar (de Perrot et al., 2003).

Uma série de eventos celulares e moleculares é ativada caracterizando a resposta inflamatória na IRP, incluindo disfunção endotelial, edema, infiltração leucocitária e liberação de citocinas (Brun-Buisson, 2000; de Perrot et al., 2003).

5.3- Repercussões na permeabilidade vascular pulmonar

As mudanças da IRP são evidentes a partir de mudanças fisiológicas, bioquímicas e histológicas.

As mudanças fisiológicas podem grosseiramente ser divididas em aumento da permeabilidade vascular, aumento da resistência vascular pulmonar (RVP) e alterações das trocas gasosas decorrentes do edema pulmonar.

A permeabilidade vascular medida pelo coeficiente de filtração capilar pulmonar, eleva-se em dez vezes após a reperfusão em modelos de IRP (Eppinger et al., 1995; Khimenko et al., 1996; Khimenko e Taylor, 1999).

O padrão de aumento da permeabilidade microvascular pulmonar parece ser bimodal (Eppinger et al., 1997). A fase inicial é mais dependente dos macrófagos pulmonares ativados, TNF- α e interferon-gamma. A fase tardia depende mais dos produtos dos neutrófilos ativados e TNF- α (Eppinger et al., 1997). Além disso, a maior parte das mudanças da permeabilidade microvascular após a IRP pode ser atribuída ao aumento da permeabilidade vascular pós-alveolar (venular) (Khimenko e Taylor, 1999).

A razão entre a RVP após a IRP e a permeabilidade vascular pulmonar (PVP), ou seja, (RVP/PVP) tem sido sugerida como fator central na indução do edema pulmonar, particularmente na fase precoce após o início da reperfusão (Khimenko et al., 1994).

Em relação ao extravasamento vascular, obtivemos importante elevação da permeabilidade vascular nos dois grupos submetidos à isquemia e reperfusão, quando comparados ao grupo *sham*, e redução do índice de permeabilidade vascular no grupo treinado, quando comparado ao grupo sedentário.

Nas duas últimas décadas a função endotelial normal tem sido identificada como fundamental para a saúde vascular (Orfanos et al., 2004).

O endotélio produz numerosos componentes vasodilatadores e vasoconstrictores que regulam o tônus vascular, onde o óxido nítrico tem-se demonstrado como o mais importante e bem caracterizado mediador, pois sua função vasodilatadora intrínseca é comumente usada como um índice de função endotelial. O estresse do cisalhamento (*shear stress*) das células endoteliais é um potente estímulo para a produção do NO, principalmente naquele treinamento físico regular, o que não é demonstrado no exercício agudo. Enquanto a redução da permeabilidade vascular pode ser atribuída ao aumento da bioatividade do NO, os detalhes deste mecanismo, por exemplo, e a importância relativa dos mediadores e efeitos antioxidantes são pouco entendidos. Parece que sessões repetidas de exercício físico podem resultar em uma adaptação endotelial, incluindo elevação do NO e aumento da capacidade vasodilatadora. A função endotelial pode melhorar

após aproximadamente sete dias de treinamento em animais e em humanos saudáveis após quatro semanas de treinamento aumenta a função endotelial relacionada ao NO (Maiorana et al., 2003).

Tem-se demonstrado que a inalação de NO por curtos períodos previamente à IRP, promovendo um condicionamento, é suficiente para proteger contra a hipertensão pulmonar, melhorar a oxigenação e a resposta inflamatória após a IRP (Waldow et al., 2004).

A evidente relação do NO com o exercício físico e a melhora da função endotelial podem explicar a relação do condicionamento físico na melhora da resposta inflamatória neste estudo, de maneira mais expressiva no edema pulmonar causado pela IRP, reduzindo aproximadamente 40% do edema resultante.

O aumento da permeabilidade vascular é potencialmente marcado pelos vasodilatadores. Sugere-se que o edema potencialmente ativado, causado por esses elementos vasodilatadores, ocorre principalmente devido à ação local de dilatação arteriolar, ocasionando o aumento do fluxo sanguíneo e subsequente perda protéica (Bucci et al., 2005). O aumento na permeabilidade vascular é o evento inicial do processo inflamatório, levando à formação do edema. Após esta mudança inicial, outros mecanismos são ativados, contribuindo para a amplificação da resposta inflamatória e lesão tecidual.

Os mediadores inflamatórios localmente produzidos nos sítios inflamatórios interagem com as células endoteliais, iniciando um edema vasogênico causado por infiltração fluida descontrolada dos vasos para os tecidos, como resultado de um aumento na permeabilidade microvascular (Lum e Roebuck, 2001).

Além disso, as ERTOs também têm sido relatadas como agentes importantes na lesão causada pela IRP, incluindo lesão endotelial e edema inflamatório (Downey, 1990; Lennon et al., 2004).

Desta forma, acreditamos que o treinamento físico que causa uma redução no edema pulmonar possa também ser atribuído a uma redução de radicais livres ou ao aumento dos sistemas de defesa antioxidante, configurando uma redução do estresse oxidativo.

Alguns autores têm demonstrado que a atividade física promove uma elevação de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase-1 e 2, catalase e glutathiona peroxidase nas células endoteliais (Davis et al., 2001).

Embora o exercício extenuante aumente o metabolismo e induza ao estresse oxidativo, existe evidência que ao longo do tempo, e de forma regular, a atividade física aumenta a defesa antioxidante provocando elevação das enzimas antioxidantes (Powers e Hamilton, 1999).

5.4- Repercussões no influxo neutrofílico

Os neutrófilos são conhecidos como uma das primeiras células responsáveis na resposta inflamatória. Primeiramente, eles são capazes de liberar radicais livres que lesam diretamente o endotélio pulmonar ou indiretamente pela ativação da caspase-3 (Novick e Gehman, 1996; Chien et al., 2000). Em segundo lugar, podem causar dano ao endotélio pulmonar e ao parênquima pela liberação da elastase e outras proteases (Fiser et al., 2001a;b). Em terceiro lugar, as membranas celulares ativadas dos neutrófilos tornam-se rígidas e ocorre a adesão entre os neutrófilos e as moléculas de adesão, resultando em seqüestração e o fenômeno do “no-reflow” (Kuhnle et al., 1998, Steimle et al., 1992).

O endotélio vascular é a principal fonte celular de oxidantes associados à lesão causada pela IRP. Um dos principais passos para se iniciar a lesão é a interação de leucócitos com o endotélio vascular (Orfanos et al., 2004)

As ERTOs - liberadas dos macrófagos alveolares e leucócitos ou formadas no epitélio pulmonar e células endoteliais - lesam o parênquima pulmonar e iniciam uma cascata de reações pró-inflamatórias com manifestações sistêmicas (Novick e Gehman 1996; Fiser et al., 2001a;b).

A lesão provocada pela isquemia e reperfusão é iniciada pela produção de ERTOs, que primeiramente aparece como responsável pela geração de atividade quimiotática para neutrófilos. Mais tarde, uma vez aderida ao endotélio, os neutrófilos

participam do dano tecidual através da secreção adicional de ERTO, como também de enzimas proteolíticas, principalmente a elastase (Welbourn et al., 1991).

No presente estudo observamos aumento não significativo dos leucócitos circulantes em animais treinados no pré-operatório, enquanto que após a isquemia e reperfusão houve elevação na atividade de mieloperoxidase nos grupos sedentário e treinado, quando comparados ao grupo *sham*; mas o exercício físico não mostrou redução no influxo tissular neutrofílico em resposta à IRP, quando comparamos os grupos treinado e sedentário.

Os neutrófilos polimorfonucleares quando ativados têm sido, há tempo, considerados como liberadores de metabólitos tóxicos do oxigênio, como o ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio; todos podendo causar lesão nas células endoteliais e parenquimatosas, agravando a lesão pulmonar (Welbourn et al., 1991). Se assumirmos que o efeito protetor do treinamento físico é consequência da sua habilidade em reduzir a produção de radicais livres, então é intrigante esta falência no influxo neutrofílico. Uma explicação poderia ser que a quantidade de ERTO, que foi gerada pela IRP regulada pela infiltração neutrofílica, não foi prevenida pelo programa de condicionamento físico empregado neste estudo, mas foi efetiva para abrandar a formação do edema. Estes resultados mostraram que o treinamento físico atenuou o componente vascular, mas não o celular, da resposta inflamatória para proteger os animais contra a agressão pulmonar. Acreditamos que sejam necessários estudos adicionais para investigar a influência do condicionamento em diferentes tempos de reperfusão pulmonar.

Em adição, estudos têm confirmado que a lesão pulmonar é resultado da ativação de mediadores inflamatórios liberados pelos neutrófilos após a reperfusão. Em modelos animais esta lesão vascular é bifásica (Eppinger et al., 1995;1997). A fase tardia é dependente do recrutamento neutrofílico; entretanto a fase precoce é independente, ocorrendo dentro de 15 minutos da reperfusão. Maxey et al., em 2004, descreveram a natureza bifásica da lesão de reperfusão após o transplante pulmonar, iniciando com os macrófagos residentes do doador, seguida por uma intensa resposta dos neutrófilos circulantes. O envolvimento das células pulmonares

residentes, como o macrófago, entretanto, não é muito bem entendido e pode ter uma participação mais importante do que inicialmente se acreditava na lesão causada pela IRP.

Conforme demonstraram Ding e colaboradores em 2005, ratos submetidos à isquemia e reperfusão cerebral após exercício físico regular por até três semanas apresentaram redução da lesão inflamatória, isto é, diminuição da expressão de mediadores inflamatórios e redução do acúmulo de leucócitos durante a reperfusão, levando à diminuição do edema cerebral. Nessa referência, o período de reperfusão maior que seis horas pode explicar o porquê da redução da atividade neutrofílica nos animais treinados, quando submetidos a maiores tempos de reperfusão.

Quando a resposta inflamatória fundamental e normalmente benéfica ocorre de maneira descontrolada, o resultado são danos tecidual e celular excessivos que provocam inflamação e destruição de tecidos normais.

5.5- Repercussões nos mediadores inflamatórios

As citocinas têm sido descritas como “amplo espectro de proteínas farmacologicamente ativas de relativo baixo peso molecular que são secretadas por uma célula com o propósito tanto para atuar em funções próprias (efeito autócrino) como nas células adjacentes (efeito parácrino)” (McDermott, 2001). Diferentes citocinas podem ter as mesmas atividades que promovem redundância dentro dos sistemas inflamatório e imune. Como resultado, não é infreqüente que a perda ou neutralização de uma citocina pode acentuadamente interferir em um desses sistemas. Esses fatos têm grande significado no desenvolvimento de estratégias terapêuticas (McDermott, 2001).

A rede de citocinas geradas entre as membranas celulares capilar e alveolar é o centro de início e propagação de resposta inflamatória, levando à lesão pulmonar (Bathia e Moochhala, 2004). As citocinas TNF- α e IL-1 β , produzidas pelos macrófagos alveolares, mostram crítico envolvimento no influxo neutrofílico (Maxey et al., 2004; Naidu et al., 2004).

A resposta integrada das citocinas à infecção e outras lesões é complexa, e a resposta tissular depende não absolutamente de suas concentrações de TNF- α e IL-1 β , mas também da presença simultânea de citocinas inibitórias e antiinflamatórias (Brun-Buisson, 2000).

A citocina antiinflamatória IL-10 inibe a liberação de TNF- α e IL-1 (Chernoff et al., 1995), e induz à produção de IL-1ra (Cassatella et al., 1994; Jenkins et al., 1994).

Por outro lado, a citocina IL-10 reduz os níveis e expressão do TNF- α gerado pelas células ativadas, e isto tem sido associado com a proteção clínica e redução em doença pulmonar (Morrison et al., 2000), incluindo lesão causada pela IRP (Moore et al., 2002). O fato de não haver alteração dos níveis séricos de IL-10 nos dados do presente estudo pode refletir a grande variabilidade e inconsistências da expressão dessas citocinas em vários estudos (Eppinger et al., 1996). Em nossos resultados, a elevação do TNF- α e IL-1 β não foi acompanhada por concomitante elevação dos níveis de IL-10, indicando que a lesão da IRP não foi seguida pela alteração desta citocina neste modelo experimental.

Os achados deste estudo demonstraram que os níveis séricos de IL-1 β foram elevados cerca de 42% após a IRP, o que reforça o importante envolvimento desta citocina na lesão causada pela IRP.

É possível que elevações mais significativas desta citocina possam ser detectadas se aumentarmos o tempo de reperfusão, como demonstrado em estudos anteriores (Khimenko et al., 1998; Krishnadasan et al., 2003).

É conhecido o pequeno, mas significativo, aumento nos níveis séricos de TNF- α encontrado após exercícios agudos extenuantes (Dufaux e Order, 1989; Espersen et al., 1990; Ostrowski et al., 1998). Ostrowski et al., em 1999, demonstraram que após exercícios físicos extenuantes ocorre elevação de TNF- α , como também aumento significativo no plasma de IL-1 β , imediatamente após o

mesmo treinamento (Cannon e Kluger, 1983; Evans et al., 1986). Mas, recentemente, estudos utilizando ensaios mais sensíveis e específicos têm encontrado somente pequenas, se existem, mudanças na concentração plasmática de IL-1 β após o exercício (Sprenger et al., 1992; Ullum et al., 1994; Drenth et al., 1995; Ostrowski et al., 1998).

A atividade física pode também atenuar a inflamação através da melhora da função endotelial. As células endoteliais são conhecidas secretoras de IL-1 e IL-6, considerando que as células endoteliais ativadas podem aumentar a produção de inerleucinas e a adesão de moléculas, induzindo à inflamação (Romano et al, 1997).

O treinamento físico reduz os marcadores inflamatórios periféricos associados com a disfunção endotelial, como moléculas de adesão vascular e intracelular solúveis, e também a proteína-1 quimioatrativa macrofágica em pacientes com falência cardíaca (Adamopoulos et al., 2001).

Colbert et al., em 2001, em um único artigo que avalia a resposta inflamatória pulmonar e exercício físico, não mostraram significante elevação nas concentrações plasmáticas ou tissulares - pulmão, cérebro, fígado e músculo - de TNF- α e IL-1 β em animais submetidos a exercício físico extenuante. No entanto, Ding et al., em 2005, mostram que os níveis de TNF- α elevam-se gradualmente após os exercícios e alcança níveis significativos após duas a três semanas de treinamento. Os dados apresentados neste trabalho mostram uma significativa elevação do TNF- α e IL-1 β nos grupos sedentário e treinado quando comparados ao grupo *sham*, seguida de redução no grupo treinado quando comparado com o sedentário, demonstrando influência do exercício físico em duas expressivas citocinas pró-inflamatórias.

Estudos mostram que tanto as condições patológicas agudas – isquemia - e crônicas - exercício físico - induzem à elevação do TNF- α . Durante o curso do condicionamento físico, os níveis de TNF- α mRNA aumentam lentamente, e, após três semanas de exercício, ficam com níveis semelhantes ao observado com 12 horas de isquemia e reperfusão em ratos não treinados. Estes

níveis lentamente elevados de TNF- α mRNA podem proteger o cérebro de lesões provocadas pela isquemia e reperfusão (Ding et al., 2005).

A expressão do fator nuclear kappa-B (NF- κ B), um fator de transcrição pró-inflamatório, atribuído como o mediador da ativação das células endoteliais iniciadas pelas citocinas, pode ser o fator-chave na inibição da inflamação causada pelo exercício. Recentes estudos demonstraram que NF- κ B, agindo como fator pró-inflamatório, teria papel importante no gatilho da resposta inflamatória iniciada pelas citocinas em isquemia transitória do miocárdio e do cérebro (Berti et al., 2002; Chandrasekar et al., 1998).

Ding et al., em 2005, referem que dados ainda não publicados por ele têm mostrado uma redução da ativação da NF- κ B em ratos isquemiados após exercício físico. Este autor acredita que o condicionamento inibiria a ativação da transcrição do NF- κ B como também a redução da expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e infiltração neutrofílica na lesão causada pela isquemia e reperfusão por um aumento gradual do TNF- α .

5.6- Resposta inflamatória remota

O tecido pulmonar é altamente vulnerável à lesão isquêmica, apesar dos elementos que podem sugerir maior proteção contra a isquemia, como a circulação brônquica e o conteúdo de O₂ alveolar (Deffebach et al., 1987).

A resposta inflamatória local no tecido pulmonar, induzida pela IRP, tem sido bem documentada em estudos prévios (Novick e Gehman, 1996; Stammberger et al., 2000; Krishnadasan et al., 2003; Maxey et al., 2004; Orfanos et al., 2004).

A isquemia é principalmente um evento local; após a reperfusão, os mediadores do tecido isquêmico entram na circulação sistêmica e afetam outros órgãos e sistemas. Diversos trabalhos experimentais demonstraram alterações da

microcirculação pulmonar secundárias à isquemia-reperfusão de órgãos a distância do pulmão (Gukovsky et al., 1998; Olanders et al., 2002; Nussler et al., 2003).

Os efeitos sistêmicos da IRP são causados pela ativação neutrofílica (Welbourn et al., 1991), sistema complemento, mediadores pró-inflamatórios (Coty et al., 1990), mediadores vasoativos como os eicosanóides, tromboxano A2 e xantina-oxidase (Anner et al., 1987; 1988; Klausner et al., 1989; Terada et al., 1992), óxido nítrico, citocinas e ERT0 (Welbourn et al., 1991; McMillen et al., 1993), expressão da glicoproteína de adesão P-selectina (Carden et al., 1993).

Neste estudo a infiltração neutrofílica foi significativamente maior no pulmão direito - não submetido diretamente ao clampeamento -, mostrando claramente que neste tempo de reperfusão de duas horas ocorreu uma participação importante dos neutrófilos ativados na circulação sistêmica, aderindo e infiltrando o tecido pulmonar, principalmente no pulmão direito. Apesar de ocorrer evidente aumento da infiltração neutrofílica em ambos os pulmões dos grupos treinado e sedentário quando comparados ao grupo *SHAM*, o condicionamento físico não reduziu o influxo neutrofílico local ou remoto.

Há evidências da participação do TNF- α na lesão pulmonar secundária à isquemia-reperfusão intestinal em ratos (Coty et al., 1990) e de fatores relacionados à interação entre polimorfonucleares ativados e o endotélio da circulação pulmonar, como a elastase de neutrófilos (Welbourn et al., 1991), o receptor da molécula de adesão de neutrófilos, CD18 (Welbourn et al., 1992) ou de moléculas de adesão na célula endotelial, como a P-selectina (Carden et al., 1993), em modelos de lesão pulmonar por isquemia-reperfusão intestinal.

No estudo de Esme e colaboradores, em 2006, estes autores sugerem que a IRP induz às lesões hepática e miocárdica caracterizadas pela ativação neutrofílica e liberação de significativa quantidade de ERT0, mostrando que a IRP é um fenômeno sistêmico.

Quanto ao índice de permeabilidade vascular, houve redução em ambos os pulmões. No entanto, esta diminuição foi significativa no pulmão direito, ou seja, de maneira remota, expressando com maior nitidez a redução do edema no pulmão que não sofreu diretamente o evento de isquemia e reperfusão. Isto pode ser explicado pela natureza das lesões. No pulmão esquerdo ocorreram efetivamente a isquemia e as alterações locais decorrentes da reperfusão; entre eles os fatores que favorecem tanto a obstrução vascular quanto a vasoconstrição, ambas levando ao comprometimento da perfusão tecidual. São fatores envolvidos na obstrução vascular a trombose nos microvasos, leucostase capilar, edema da célula endotelial, hemoconcentração intravascular com aumento da viscosidade sangüínea e edema intersticial causando compressão de origem extravascular (Menger, 1995).

No pulmão direito as manifestações relacionadas à resposta inflamatória não sofreram interferências do clampeamento, mas foram decorrentes da liberação na circulação de interleucinas e neutrófilos ativados no pulmão esquerdo, o que pode também se manifestar em toda a rede endotelial do organismo, de maneira sistêmica.

Acreditamos que na resposta inflamatória remota provocada no pulmão direito tenha provavelmente a participação das ERTs, do TNF- α , da IL-1 β , além dos neutrófilos ativados. Os mecanismos antioxidantes podem ter participação ativa tanto na elevação da permeabilidade vascular como na redução causada pelo exercício físico em ambos os pulmões. Outros fatores que devem ser lembrados quando se trata do envolvimento do condicionamento físico, incluem a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), fator nuclear kappa-B, Cox-2, enzimas antioxidantes e a *heat shock protein* (Tsai et al., 2004), mas não foram motivo deste estudo.

5.7- Considerações finais

O condicionamento descreve o fenômeno pelo qual um estímulo traumático ou estressante confere proteção contra lesões subseqüentes. Originalmente reconhecido em corações de cães submetidos a provocações

isquêmicas, o condicionamento tem sido demonstrado em múltiplas espécies, pode ser induzido por vários estímulos, e é aplicável em diferentes órgãos e sistemas. Importante progresso tem sido feito para elucidar o sinal de transdução da cascata do condicionamento. O condicionamento representa uma potente condição protetora tecidual, e os entendimentos de seus mecanismos podem permitir aplicações clínicas seguras (Tsai et al., 2004).

Este é o primeiro estudo identificado a investigar os efeitos do exercício físico regular (condicionamento físico) na indução de mediadores protetores do pulmão e nos níveis de proteção pulmonar durante a isquemia e reperfusão.

Consideramos que o condicionamento físico resultou em alterações significativas na resposta inflamatória de animais submetidos à IRP normotérmica. O seu efeito mais evidente ocorreu sobre o componente vascular e na redução de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , duas das mais importantes citocinas da resposta inflamatória precoce na IRP.

Observamos nítida interferência no índice de permeabilidade vascular com menor extravasamento de albumina marcada nos pulmões de animais submetidos a treinamento físico, o que de certa maneira pode ser explicada principalmente pela provável elevação de ERT, visto que a presença de neutrófilos e sua infiltração tissular medida pela mieloperoxidase não se alteraram após o condicionamento físico.

O exercício físico produz em curto prazo um efeito inflamatório. No entanto, estudos de coorte e longitudinal demonstraram que, em longo prazo, o exercício apresenta um efeito antiinflamatório, em que a redução na resposta à inflamação pode contribuir aos conhecidos benefícios de uma atividade física regular (Kasapis e Thompson, 2005). Podemos dizer que o exercício físico regular atuaria como uma vacina antiinflamatória que promove uma imunização do indivíduo, reduzindo ou atenuando a resposta inflamatória crônica, ou de maneira aguda quando este é exposto a algum agente agressor mais intenso.

A redução da resposta inflamatória na IRP causada pelo exercício físico regular foi determinada neste trabalho.

Estas considerações geram uma série de indagações que deverão ser respondidas com novas pesquisas, onde incluímos se o tempo de reperfusão pode interferir na resposta neutrofílica como ocorre no cérebro, demonstrado por Ding et al., em 2005, em que foram considerados maiores períodos de reperfusão.

Pergunta-se qual seria a participação dos agentes antioxidantes na redução da permeabilidade vascular pulmonar relacionada ao exercício físico.

Questiona-se se dentro do benefício fisiopatológico causado pelo condicionamento físico na IRP poderia haver mais moléculas envolvidas, como *heat shock protein*, conforme Lennon et al., em 2004, no miocárdio, nas moléculas de adesão endotelial (ICAM -1) segundo Ding et al., em 2005, no cérebro.

Questiona-se também se as alterações inotrópicas e cronotrópicas no coração causadas pelo exercício físico, levando a uma melhora na pós-carga ventricular poderiam influenciar a resposta inflamatória na IRP.

Outra questão que surge é se a proteína-C reativa (PCR) poderia ser um marcador confiável na resposta inflamatória pulmonar, como se tem mostrado no miocárdio, conforme Kasapis e Thompson em 2005.

Pergunta-se, ainda, se existe benefício do condicionamento físico na resposta inflamatória causada pela IRP em outros órgãos, além da resposta remota que observamos no pulmão contralateral, atribuída à infiltração neutrofílica e à liberação de ERT0, conforme Esme et al., em 2006.

Detalhes dos mecanismos para explicar a proteção induzida pelo condicionamento físico contra a lesão causada pela IRP permanecem desconhecidos.

Surgem então questionamentos para futuras pesquisas no complexo, interligado e sutil sistema inflamatório na IRP e sua relação com o condicionamento físico.

6- CONCLUSÕES

Os efeitos do condicionamento físico (exercício físico) em ratos submetidos à isquemia por 90 minutos e reperfusão pulmonar por 120 minutos foram:

1. Redução não significativa da permeabilidade vascular pulmonar no pulmão esquerdo, mas significativa no pulmão direito.
2. Não houve alteração nos níveis de atividade da mieloperoxidase local no pulmão esquerdo e remota no pulmão direito.
3. Redução dos níveis séricos de interleucinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β .
4. Não alterou os níveis séricos da interleucina antiinflamatória IL-10.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramson JL, Vaccarino V. Relationship between physical activity and inflammation among apparently healthy middle-aged and older US adults. *Arch Intern Med* 2002; 162:1286-92.
- Adamopoulos S, Parissis J, Kroupis C, Georgiadis M, Karatzas D, Karavolias G, et al. Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 2001; 22:791-7.
- Al Mehdi AB, Shuman H, Fisher AB. Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia. *Am J Physiol* 1997; 272:294-300.
- Al Mehdi Ab, Zhao G, Dodia C, Tozawa K, Costa K, Muzykantov V, et al. Endothelial NADPH oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or high K⁺. *Circ Res* 1998a, 83:730-7.
- Al Mehdi AB, Zhao G, Fisher AB. ATP-independent membrane depolarization with ischemia in the oxygen-ventilated isolated rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998b; 18:653-61.
- Allison RC, Kyle J, Adkins WK, Prasad VR, McCord JM, Taylor AE. Effect of ischemia reperfusion or hypoxia reoxygenation on lung vascular permeability and resistance. *J Appl Physiol* 1990; 69:597-603.
- Anner H, Kaufman JR, Kobzik L, Valeri, CR, Shepro D, Hechtman HB. Pulmonary hypertension and leukosequestration after lower torso ischemia. *Ann Surg* 1987; 206:642-8.
- Armstrong L, Milla AB. Relative production of tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome. *Thorax* 1997; 52:442-6.
- Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty JL, Lvine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967; 2:319-23.
- Ashraf M, Zhai X. Patophysiology of myocardial reperfusion injury:role of oxygen free radicals. *Transplant Proc* 1995; 27:2000-1.

Atochina EN, Muzykantov VR, Al-Mehdi AB, Danilov SM, Fisher AB. Normoxic lung ischemia reperfusion accelerates shedding of angiotensin converting enzyme from the pulmonary endothelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1114-9.

Ballou SP, Lozanski FB, Hodder S, Rzewnicki DL, Mion LC, Sipe JD, et al. Quantitative and qualitative alterations of acute-phase proteins in healthy elderly persons. *Age Ageing* 1996; 25:224-30.

Barnes PJ, Belvisi MG. Nitric oxide and lung disease. *Thorax* 1993; 48:1034-43.

Baron P, Gomez-Marin O, Casas C, Heil J, Will N. Renal preservation after warm ischemia using oxygen free radical scavengers to prevent reperfusion injury. *J Surg Res* 1991; 51(1), 60-5.

Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants. *State Ar Am J Med* 1991; 91:2-13.

Bathia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004; 202:145-56.

Bayati A, Christofferson R, Kallskog O, Wolgast M. Mechanism of erythrocyte trapping in ischaemic acute renal failure. *Acta Physiol Scand* 1990; 138:13-23.

Belsten JI, Wright AJ. European Community- FLAIR common assay for whole-blood glutathione peroxidase (GSH-Px); results of an inter-laboratory trial. *Eur J Clin Nutr* 1995; 49:921-7.

Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:818-24.

Bernier M, Hearse DJ, Manning AS. Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen-derived free radicals. Studies with "anti-free radical" interventions and a free radical-generating system in the isolated perfused rat heart. *Circ Res Mar* 1986; 58:331-40.

Bersohn MM, Scheuer J. Effect of ischemia in the performance of hearts from physically trained rats. *Am J Physiol* 1978; 234:215-8.

- Berti R, Willians AJ, Moffett JR. Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia-reperfusion brain injury. *J Cerebral Blood Flow Metab* 2002; 22(9): 1068-79.
- Blair SN, Cheng Y, Holder JS. Is physical activity or physical fitness more important in defining health benefits? *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33:379-99.
- Blake DR, Allen RE, Lunec J. Free radicals in biological systems- a review orientated to inflammatory processes. *Br Med Bull* 1987; 43:371-85.
- Boosalis MG, Snowdon DA, Tully CL, Gross MD. Acute phase response and plasma carotenoid concentrations in older women: findings from the nun study. *Nutrition* 1996; 12:475-8.
- Boule NG, Haddad E, Kenny GP, Wells GA, Sigal RJ. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. *JAMA* 2001; 286:1218-27.
- Bowles DK, Farrar RP, Starnes JW. Exercise training improves cardiac function after ischemia in the isolated, working rat heart. *Am J Physiol* 1992; 263:804-9.
- Bowles DK, Starnes JW. Exercise training improves metabolic response after ischemia in isolated working rat heart. *J Appl Physiol* 1994; 76(4):1608-14.
- Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78:206-9.
- Breda MA, Hall TS, Stuart S. Twenty-four hour lung preservation by hypothermia and leukocyte depletion. *J Heart Transplant* 1985; 4:325-9.
- Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med* 2000; 26:64-74.
- Bruunsgaard H, Pedersen NA, Schroll M, Skinhoj P, Pedersen BK. Impaired production of proinflammatory cytokines in response to lipopolysaccharide (LPS) stimulation in elderly humans. *Clin Exp Immunol* 1999; 118:235-41.

- Bruunsgaard H. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. *J Leukoc Biol* 2005;78:819-35.
- Bucci M, Roviezzo F, Posadas I, Yu J, Parente L, Sessa W, et al. Endothelial nitric oxide synthase activation is critical for vascular leakage during acute inflammation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:904-8.
- Burton KP, Hagler HK, Nazeran H. Exposure to free radicals alters ionic calcium transients in isolated adult rat cardiac myocytes. *Am J Cardiovasc Pathol* 1982; 4:235-44.
- Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann Rev Biochem* 1989; 58:79-110.
- Calvin SH, Ng et al. Inflammatory response to pulmonary ischemia-reperfusion injury. *Surgery Today* 2006; 36:205-14.
- Cannon JG, Kluger MJ. Endogenous pyrogen activity in human plasma after exercise. *Science* 1983; 220:617-9.
- Carden DL, Young JA, Granger DN. Pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion: role of P-selectin. *J Appl Physiol* 1993; 75: 2529-34.
- Cassatella MA, Meda L, Gasperini S, Calzetti, Bonora S. Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. *J Exp Med* 1994;179:1695-9.
- Castell LM, Poortmans JR, Leclercq R, Brasseur M, Duchateau J, Newsholme EA. Some aspects of the acute phase response after marathon race, and the effects of glutamine supplementation. *Eur J Appl Physiol* 1997; 75:47-53.
- Catly MG, Guice KS, Oldham KT, Remick DG, Kunkel SL. Evidence for tumor necrosis factor-induced pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Ann Surg* 1990; 212:694-700.
- Chandrasekar B, Streitman JE, Colston JT, Freeman GL. Inhibition of nuclear factor kappa B attenuates proinflammatory cytokine and inducible nitric-oxide synthase expression in postischemic myocardium. *Biochim Biophys Acta* 1998; 27: 91-106.

- Chang DM, HSU K, Ding YA, Chiang CH. Interlukin-1 in ischemia-reperfusion acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1230-4.
- Cheeseman KH, Slater TF. Uma introdução à bioquímica dos radicais livres. In: Radicais livre em medicina. Rio de janeiro: Interlivros; 1996. p.1-14.
- Chernoff AE, Granowitz EV, Shapiro L, Vannier E, Lonnemann G, Angel JB, et al. A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. *J Immunol* 1995; 154:5492-9.
- Chien CT, Hsu SM, Chen SF, Lee PH, Lai MK. Prolonged ischemia potentiates apoptosis formation during reperfusion by increase of caspase 3 activity and free radical generation. *Transplant Proc* 2000; 32(7), 2065-6.
- Cipolle MD, Pasquale MD, Cerra FB. Disfunção secundária de órgãos: das perspectivas clínicas aos mediadores. *Clin Terap Int* 1993; 2:259-96.
- Cochrane CG, Spragg RG, Revak SD, Schraufstatter I. Biochemical factors in pulmonary inflammatory disease. *Chest* 1983; 83:67-70.
- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420:885-91.
- Colbert LH, Davis JM, Essig DA, Ghaffar A, Mayer EP. Tissue expression and plasma concentrations of TNF-alpha, IL-1, and IL-6 following treadmill exercise in mice. *Int J Sports Med* 2001; 22:261-7.
- Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 2001; 60:349-56.
- Cotgreave IA, Moldeus P, Orrenus S. Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1988; 28:189-212.
- Curello S, Ceconi C, De Giuli F, Panzali AF, Milanese B, Calarco M, et al. Oxidative stress during reperfusion of human hearts: potential sources of oxygen free radicals. *Cardiovas Res* 1995; 29:118-25.
- Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 2004; 25:4-7.

Das DK. Cellular, biochemical and molecular aspects of reperfusion injury. Introduction. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 723:12-6.

Dasgupta A, Malhotra D, Levy H. Decreased total antioxidant capacity but normal lipid hydroperoxide concentrations in sera of critically ill patients. *Life Sci* 1997; 60:335-40.

Date H, Matsumura A, Manchester JK, Obo H, Lima O, Cooper JM, et al. Evaluation of lung metabolism during successful twenty-four-hour canine lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 105:480-91.

Davis DP, Videen JS, Marino A, Vilke GM. Exercise-associated hyponatremia in marathon runners: a two-year. *J Emerg Med* 2001; 21:47-57.

de Perrot M, Fischer S, Liu M, Jin R, Bai XH, Waddell TK, et al. Prostaglandin E1 protects lung transplants from ischemia-reperfusion injury, a shift from pro- to anti-inflammatory cytokines. *Transplantation* 2001; 72:1505-12.

de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury - State of the Art. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:490-511.

Deeb GM, Grum CM, Lynch MJ. Neutrophils are not necessary for induction of ischemia-reperfusion lung injury. *J Appl Physiol* 1990; 68:374-81.

Deffebach ME, Charan NB, Lakshminarayan S, Butler J. The bronchial circulation. Small, but a vital attribute of the lung. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:463-81.

Defraigne JO, Detry O, Pincemail J, Franssen C, Meurisse M, Lamy M, et al. Direct evidence of free radical production after ischaemia and reperfusion and protective effect of desferrioxamine: ESR and vitamin E studies. *Eur J Vasc Surg* 1994; 8:537-43.

Del Maestro RF, Thaw HH, Björk J, Planker M, Arfors K. Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiol Scand* 1980; 492:43-57.

Del Sodato P, Campieri M, Brignola C, Bazzocchi G. A possible mechanism of action of sulfasalazine and 5-aminosalicylic acid in inflammatory bowel diseases: interaction with oxygen free radicals. *Gastroenterology* 1985; 89:1215-6.

Demirel HA, Powers SK, Caillaud C, Coombes JS. Exercise training reduces myocardial lipid peroxidation following short-term ischemia-reperfusion. *Med Sci Sports Exerc* 1998; 30:1211-6.

Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA. Short-term exercise improve myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol* 2001; 91: 2205-12.

Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:194-200.

Ding YH, Young CN, Luan X, Li J, Rafols JA, Clark JC, et al. Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion. *Acta Neuropathol* 2005; 109:237-46.

Dobbs RJ, Charlett A, Purkiss AG, Dobbs SM, Weller C, Peterson DW. Association of circulating TNF-alpha and IL-6 with ageing and parkinsonism. *Acta Neurol Scand* 1999; 100:34-41.

Dormandy TL. Free- radical oxidation and antioxidants. *Lancet* 1978; 1:647-50.

Dormandy TL. Free- radical pathology and medicine. A review. *J R Coll Physicians Lond* 1989; 23:221-7.

Downey JM. Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. *Ann Rev Physiol* 1990; 52:487-504.

Drenth JP, van UU SH, van Deuren M, Pesman GJ, van der vem Jongekrug J, van der Meer J. Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulating ex vivo TNF-alfa and IL-1beta production. *J Appl Physiol* 1995; 79:1497-503.

Dufaux B , Order U. Plasma elastase-alpha 1-antitrypsin, neopterin, tumor necrosis factor, and soluble interleukin-2 receptor after prolonged exercise. *Int J Sports Med* 1989; 10:434-8.

Eckenhoff RG, Dodia C, Tan Z, Fisher AB. Oxygen-dependent reperfusion injury in the isolated rat lung. *J Appl Physiol* 1992; 72:1454-60.

- Engelman DT, Watanabe M, Engelman RM, Rousou JA, Flack JE, Deaton DW, et al. Constitutive nitric oxide release is impaired after ischemia and reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110:1047-53.
- Eppinger MJ, Jones ML, Deeb M, Bolling SF, Ward PA. Pattern of injury and the role of neutrophils in reperfusion injury of rat lung. *J Surg Res* 1995; 58:713-8.
- Eppinger MJ, Ward PA, Bolling SF, Deeb GM. Regulatory effects of interleukin-10 on lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112:301-5.
- Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol* 1997; 150:1773-84.
- Esme H, Fidan H, Koken T, Solak O. Effect of lung ischemia-reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissues. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 29:294-8.
- Espersen GT, Elbaek A, Ernst E, Toft E, Kaalund S, Jersild C, et al. Effect of physical exercise on cytokines and lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *APMIS* 1990; 98:395-400.
- Evans WJ, Meredith CN, Cannon JG, Dinarello CA, Frontera WR, Hughes VA. Metabolic changes following eccentric exercise in trained and untrained men. *J Appl Physiol* 1986; 61:1864-8.
- Fallon KE, Fallon SK, Boston T. The acute phase response and exercise: court and field sports. *Br J Sport Med* 2001; 35:170-73.
- Farivar AS, Woolley SM, Fraga CH, Thomas R, Salzman AL, Szabo C, et al. Intratracheal poly (adp) ribose synthase inhibition ameliorates lung ischemia reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2004; 77:1938-43.
- Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J* 2002; 16:1335-47.
- Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Alfieri O, Pardini A. Oxygen free radicals and myocardial damage: protective role of thiol-containing agents. *Am J Med* 1991; 91:95-105.

- Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil* 1997; 43:61-8.
- Fiorentino D, Zlotnik A, Mosmann T, Howard M, O'garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147: 3815-3822.
- Fisher AB, Dodia C, Tan ZT, Ayene I, Eckenhoff RG. Oxygen-dependent lipid peroxidation during ischemia. *J Clin Invest* 1991; 88:674-9.
- Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Kern JA, Kron IL. Pulmonary macrophages are involved in reperfusion injury after lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 2001a; 71:1134-8.
- Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Cope JT, Laubach VE. Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response. *J Thorac Cardiovas Surg* 2001b; 121:1069-75.
- Flaherty JT. Myocardial injury mediated by oxygen free radicals. *Am J Med* 1991; 91:79-85.
- Frederiks WM, Kooji A, Bosch KS. Role of xanthine oxidase activity in tissue damage of rat liver after ischemia. *Transpl Proc* 1995; 27:2855-6.
- Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47:412-26.
- Fridovich I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1970;245:4053-7.
- Fubini B, Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Radic Biol Med* 2003; 34:1507-16.
- Garcia-Valdecasas JC, Rull R, Grande L, Fuster J, Rimola A, Lacy AM. Prostacyclin, thromboxane, and oxygen free radicals and postoperative liver function in human liver transplantation. *Transplantation* 1995; 60:662-7.
- Gaston B, Drazen Jm, Loscalzo J, Stamler JS. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:538-51.

- Geffken DF, Cushman M, Burke GL, Polak JF, Sakkinen PA, Tracy RP. Association between physical activity and markers of inflammation in a healthy elderly population. *Am J Epidemiol* 2001; 153:242-50.
- Gey KF, Moser UK, Jordan P, Stahelin HB, Eichholzer M, Ludin E. Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants: an epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C. *Am J Clin Nutr* 1993; 57:787-97.
- Goligorsky MS, Morgan MA, Suh H, Safirstein R, Johnson R. Mild oxidative stress: cellular mode of mitogenic effect. *Ren Fail* 1992; 14:385-9.
- Granger DN, Höllwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: role of the oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand* 1986; 548:47-63.
- Gukovsky I, Gukovskaya AS, Blinman TA, Zaninovic V, Pandol SJ. Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am J Physiol* 1998; 275:1402-14.
- Gutteridge JM. Aspects to consider when detecting and measuring lipid peroxidation. *Free Radic Res Commun* 1986; 1:173-84.
- Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 1990;15:129-35.
- Haglund U, Gerdin B. Oxygen-free radicals (OFR) and circulatory shock. *Cir Shock* 1991; 34:405-11.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* 1984; 1:1396-7.
- Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280:1-8.
- Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91:14-22.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;19:598-620.

- Heard SO, Fink M. The multiple organ failure syndrome. In: Rippe JM, Irwin RS, Alpert JS, Fink MP. (eds). **Intensive care medicine**. 2nd ed, Boston: Little Brown; 1991. p.1515-32.
- Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. **J Moll Cell Cardiol** 1973; 5:395-407.
- Heffner JE, Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidants defense. **Am Rev Respir Dis** 1989; 140:531-54.
- Hellsten Y, Frandsen U, Orthenblad N, Sjodin N, Richter EA. Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role of inflammation. **J Physiol** 1997; 498:239-48.
- Hennekens CH, Buring JE, Peto R. Antioxidant vitamins- benefits not yet proved. **N Engl J Med** 1994; 330:1080-1.
- Hocking DC, Phillips PG, Ferro TJ, Johnson A. Mechanism of pulmonary edema induced by tumor necrosis factor-alfa. **Circ Res** 1990; 67:68-77.
- Homans DC, Asinger R, Pavsek T, Crampton M, Lindstrom P, Peterson D, et al. Effect of superoxide dismutase and catalase on regional dysfunction after exercise-induced ischemia. **Am J Physiol** 1992; 263:392-8.
- Howard M, O'garra A, Ishida H, Malefyt RD, Devrics J. Biological properties of interleukin-10. **J Clin Immunol** 1992; 12:239-47.
- Hyslop AP, Hinshaw DB, Halsey WA Jr, Schraufstatter LU, Sauerheber RD, Spragg RG. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. **J Biol Chem** 1988; 263:1665-75.
- Imlay JA, Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. **Science** 1988; 240:1302-9.

Ingold KU, Webb AC, Witter D, Burton GW, Metcalfe TA, Muller DP. Vitamin E remains the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering severe Vitamin E deficiency . **Arch Biochem Biophys** 1987; 259:224-5.

Inoue G. Effect of interleukin-10 (IL-10) on experimental LPS- induced acute lung injury. 6: **J Infect Chemother** 2000; 51-60.

Ito K, Shimada J, Kato D, Toda S, Tomohisa T, Naito Y, et al. Protective effects of preischemic treatment with pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-ligand, on lung ischemia-reperfusion injury in rats. **Eur J Cardiothorac Surg** 2004; 4:530-6.

Jenkins JK, Malyak M, Arend WP. The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. **Lymph Cytok Res** 1994; 13:47-54.

Jones DR, Becker RM, Hoffmann SC, Lemasters JJ, Egan TM. When does the lung die? Kfc, cell viability, and adenine nucleotide changes in the circulation-arrested rat lung. **J Appl Physiol** 1997; 83:247-52.

Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Burdick MD, Kunkel SL. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. **J Immunol** 1994; 152:3559-69.

Kasapis C, Thompson PD. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. **J Am Coll Cardiol** 2005; 45:1563-9.

Keating SVM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumour necrosis factor-induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. **Am J Respir Crit Care Med** 1996; 153:530-4.

Kelly RF. Current strategies in lung preservation. **J Lab Clin Med** 2000; 136:427-40.

Khimenko PL, Barnard JW, Moore TM, Wilson PS, Ballard ST, Taylor AE. Vascular permeability and epithelial transport effects on lung edema formation in ischemia and reperfusion. **J Appl Physiol**. 1994 Sep;77(3):1116-21

- Khimenko PL, Moore TM, Wilson PS, Taylor AE. Role of calmodulin and myosin light-chain kinase in lung ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1996; 271:121-5.
- Khimenko PL, Bagby GJ, Fuseler J, Taylor AE. Tumor necrosis factor-alpha in ischemia and reperfusion injury in rat lungs. *J Appl Physiol* 1998; 85:2005-11.
- Khimenko PL, Taylor AE. Segmental microvascular permeability in ischemia-reperfusion injury in rat lung. *Am J Physiol* 1999; 276:958-60.
- King DE, Carek P, Mainous Ag III, Pearson WS. Inflammatory markers and exercise: differences related to exercise type. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35:575-81.
- Klausner JM, Paterson IS, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Oxygen free radicals mediate ischemia-induced lung injury. *Surgery* 1989; 105:192-9.
- Koga S, Morris S, Ogawa S, Liao H, Bilezikian JP, Chen G. TNF modulates endothelial properties by decreasing c AMP. *Am J Physiol* 1995; 268:1104-13.
- Kohn DF, Wixson SK, White I, Benson GI. Anesthesia and analgesia in laboratory animals. Londres: Academic Press; 1997. 426p.
- Krishnadasan B, Naidu BV, Byrne K, Fraga C, Verrier ED, Mulligan MS. The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125:261-72.
- Krishnadasan B, Farivar AS, Naidu BV, Wolley SM, Byrne K, Fraga CH, et al. β -chemokine function in experimental lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2004; 77:1056-62.
- Kuhnle GEH, Reichenspurner H, Lange T. Microhemodynamics and leukocyte sequestration after pulmonary ischemia and reperfusion in rabbits. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115:937-44.
- Kurose L, Granger, N. Evidence implicating xanthine oxidase and neutrophils in reperfusion-induced microvascular dysfunction. *Ann N Y Acad of Sci* 1994; 723:158-79.
- Kusske AM, Rongione AJ, Ashley SW, Mcfadden DW, Reher HA. Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice. *Surgery* 1996; 120:284-8.

- Langberg H, Olesen JL, Gemmer C, Kjaer M. Substantial elevation of interleukin-6 concentration in peritendinous tissue, in contrast to muscle, following prolonged exercise in humans. *J Physiol* 2002; 542:985-90.
- Lansman JB. Endothelial mechanosensors: going with the flow. *Nature* 1988; 331:481-2.
- Lefer AM, Lefer DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory sock. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993; 33:71-90.
- Lennon SL, Quindry JC, French JP, Kim S, Mehta JL, Powers SK. Exercise and myocardial tolerance to ischemia-reperfusion. *Acta Physiol Scand* 2004; 182:161-9.
- Lentsch AB, Czermak BJ, Bless Nm, Van Rooijen N, Ward PA. Essential role of alveolar macrophages in intrapulmonary activation of NF-kappaB. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:692-9.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105:1135-43.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420:868-74.
- Libonati JR, Gaughan JP, Hefner CA, Gow A, Paolone AM, Houser SR. Reduced ischemia and reperfusion injury following exercise training. *Med Sci Sports Exerc* 1997; 29:509-16.
- Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, del Castillo MD. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhance chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med* 1995; 18:153-8.
- Lo CJ, Fu M, Cryer HG. Interleukin 10 inhibits alveolar macrophage production of inflammatory mediators involved in adult respiratory distress syndrome. *J Surg Res* 1998; 79:179-84.
- Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell* 2001; 280:719-41.
- Lykens MG, Davis WB, Pacht ER. Antioxidant activity of bronchoalveolar lavage fluid in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Physiol* 1992; 262:169-75.

- Lyngso D, Simonsen L, Bulow J. Interleukin-6 production in human subcutaneous abdominal adipose tissue: the effect of exercise. *J Physiol* 2002; 543:373-8.
- Maier RV, Bulger EM. Endothelial changes after shock and injury. *New Horizons* 1996; 4:211-23.
- Maiorana A, O'driscoll G, Taylor R, Green D. Exercise and the nitric oxide vasodilator system. *Sports Med* 2003; 33:1013-35.
- Martinez- Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 1995; 77:147-61.
- Mattusch F, Dufaux B, Heine O, Mertens I, Rost R. Reduction of the plasma concentration of C-reactive protein following nine months of endurance training. *Int J Sports Med* 2000; 21:21-4.
- Maxey TS, Enelow RI, Gaston B, Kron IL, Laubach VE, Doctor A. Tumor necrosis factor-alfa from resident lung cells is a key initiating factor in pulmonary ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Card Surg* 2004; 127:541-7.
- McDermott MF. TNF and TNFR biology in health and disease. *Cell Mol Biol* 2001; 47:619-35.
- McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312:159-63.
- McMillen MA, Huribal M, Sumpio B. Common pathway of endothelial-leukocyte interaction in shock, ischemia, and reperfusion. *Am J Surg* 1993; 166:557-62.
- Menger MD. Microcirculatory disturbances secondary to ischemia-reperfusion. *Transpl Proc* 1995; 27:2863-5.
- Meyers BF, Lynch J, Trulock EP, Guthrie TJ, Cooper JD, Patterson GA. Lung transplantation: a decade of experience. *Ann Surg* 1999; 230:362-70.
- Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC. Oxidative stress, antioxidants and animal function. *J Dairy Sci* 1993; 76:2812-23.

- Moldoveanu AI, Shephard RJ, Shek PN. Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1beta, IL-6 and TNF-alfa in blood mononuclear cells. *J Appl Physiol* 2000; 89:1499-504.
- Moore KW, O'garra A, De Waal MR, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Ann Rev Immunol* 1993; 11:165-90.
- Moore TM, Shirah WB, Khimenko PL, Paisley P, Lausch RN, Taylor AE. Involvement of CD40 - CD40L signalling in postischemic lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283:1255-62.
- Morrison DF, Foss DL, Murtaugh MP. Interleukin-10 gene therapy-mediated amelioration of bacterial pneumonia. *Infect Immun* 2000; 68:4752-8.
- Moslen MT, Smith CV. **Radicais livres: mecanimos de lesão tecidual**. Rio de Janeiro: Interlivros; 1995.
- Mulholland CW, Strain JJ. Total peroxy radical trapping ability of serum: relationship to secondary antioxidant concentrations. *Biochem Soc Trans* 1990; 18:1169-70.
- Mulholland CW, Strain JJ. Serum total free radical trapping ability in acute myocardial infarction. *Clin Biochem* 1991; 24:437-41.
- Mulholland CW, Strain JJ. Total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) of plasma: effects of supplementation of young healthy volunteers with large doses of alpha-tocopherol and ascorbic acid. *Int J Vitam Nutr Res* 1993; 63:27-30.
- Myers SI, Horton JW, Hernandez R, Walker PB, Vaughan WG. Pentoxifylline protects splanchnic prostacyclin synthesis during mesenteric ischemia/reperfusion. *Prostaglandins* 1994; 47:137-50.
- Naidu BV, Woolley SM, Farivar AS, Thomas R, Fraga CH, Goss CH, et al. Early tumor necrosis factor-alfa release from the pulmonary macrophage in lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovas Surg* 2004; 127:1502-8.
- Nezu K, Koshibe K, Tojo T, Sawabata N, Kawachi K. Protection against lipid peroxidation induced during preservation of lungs for transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1994;13:998-1002.

- Northoff H, Weinstock C, Berg A. The cytokine response to strenuous exercise. *Int J Sports Med* 1994; 15:167-71.
- Novick RJ, Gehman KE, Ali IS, Lee J. Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity. *Ann Thorac Surg* 1996; 62:302-14.
- Nussler NC, Muller AR, Weidenbach H, Verpoulos A, Platz KP, Volk HD, et al. IL-10 increases tissue injury after selective intestinal ischemia/reperfusion. *Ann Surg* 2003; 238:49-58.
- Nybo L, Nielsen B, Pedersen BK, Moller K, Secher NH. Interleukin-6 release from the human brain during prolonged exercise. *J Physiol* 2002; 542:991-5.
- Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest* 1988; 81:1162-72.
- Olanders K, Sun Z, Borjesson A, Dib M, Anderson E, Lasson A, et al. The effect of intestinal ischemia and reperfusion injury on ICAM-1 expression, endothelial barrier function, neutrophil tissue influx, and protease inhibitor levels in rats. *Shock* 2002; 18:86-92.
- Oredsson S, Plate G, Qvarfordt P. Reperfusion injury in skeletal muscle. *Transplant Proc* 1995; 27:2831-3.
- Orfanos SE, Mavrommati I, Korovesi I, Roussos C. Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill. *Intensive Care Med* 2004; 30:1702-14.
- Ostrowski K, Hermann C, Bangash A, Schjerling P, Nielsen JN, Pedersen BK. A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. *J Physiol* 1998; 513:889-94.
- Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Pro and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol* 1999; 515:287-91.

- Ostrowski K, Schjerling P, Pedersen BK. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans-effect of intensity of exercise. *Eur J Appl Physiol* 2000; 83:512-5.
- Ostrowski K, Rohde T, Asp A, Schjerling P, Pedersen BK. Chemokines are elevated in plasma after strenuous exercise in humans. *Eur J Appl Physiol* 2001; 84:244-5.
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70:158-69.
- Paolisso G, Rizzo MR, Mazziotti G, Tagliamonte MR, Gambardella A, Rotondi M, et al. Advancing age and insulin resistance: role of plasma tumor necrosis factor- α . *Am J Physiol* 1998; 275:294-9.
- Parke DV, Sapota A. Chemical toxicity and reactive oxygen species. *Int J Occup Med Environ Health* 1996; 9:331-40.
- Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986; 250:G 749-53.
- Pattanaik U, Prasad K. Endotoxemia and oxidative stress. *Ann NY Acad Sci* 1996; 793:506-10.
- Pearse DB, Wagner EM. Role of the bronchial circulation in ischemia-reperfusion lung injury. *J Appl Physiol* 1994; 76:259-65.
- Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Physiol Rev* 2000; 80:1055-81.
- Pedersen BK, Steensberg A, Schjerling P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J Physiol* 2001; 536:329-37.
- Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 2005; 98:1154-62.
- Powers SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, et al. Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol* 1998; 275:1468-77.
- Powers SK, Hamilton K. Antioxidants and exercise. *Clin Sports Med*. 1999; 18: 525-36.

- Pretolani M . Interleukin-10: an anti-inflammatory cytokine with therapeutic potential. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:1164-71.
- Priviero F, De Nucci G, Antunes E, Zanesco A. Negative chronotropic response to adenosine receptor stimulation in rat right atria after run training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31:741-3.
- Pryor WA. Cancer and free radicals. *Basic Life Sci* 1986; 39:45-59.
- Putensen C, Wrigge H. Ventilator-associated systemic inflammation in acute lung injury. *Intensive Care Med* 2000; 26:1411-3.
- Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 2000; 16:534-54.
- Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury 1993 *Br Med Bull* Jul;49(3):700-18
- Reece TB, Ellman PI, Maxey TS, Crosby IK, Warren PS, Chong TW, et al. Adenosine A2a receptor activation reduces inflammation and preserves pulmonary function in na in vivo model of lung transplantation. *J Thorac Cardiovas Surg* 2005; 129:1137-43.
- Riedemann NC, Ward PA. Complement in ischemia reperfusion injury. *Am J Pathol* 2003; 162:363-7.
- Riemersma RA, Wood DA, Macintyre CC, Elton RA, Gey KF, Oliver MF. Anti-oxidants and pro-oxidants in coronary heart disease. *Lancet* 1991; 337:677.
- Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*, 1997, 6(3): 315-25.
- Ross R. Atherosclerosis- an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-26.
- Ross SD, Tribble CG, Gaughen JR, Shockey KS, Parrino PE, Kron IL. Reduced neutrophil infiltration protects against lung reperfusion injury after transplantation. *Ann Thorac Surg* 1999; 67:1428-34.
- Scannell G. Leukocyte responses to hypoxic/ischemic conditions. *New Horizons* 1996; 4:179-83.

- Scheuer J, Tipton CM. Cardiovascular adaptations to physical training. *Ann Rev Physiol* 1977; 39:221-51.
- Schiller HJ, Reilly PM, Bulkley GB. Antioxidant therapy. *Crit Care Med* 1993; 21:92-102.
- Schumacker PT, Sansel RW. Oxygen delivery and uptake by peripheral tissues: physiology and pathophysiology. *Crit Care Med* 1989; 13:223-9.
- Seitz MLP, Dewald B, Towbin H, Gallati H, Baggiolini M. Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts. *Eur J Immunol* 1995; 25:1129-32.
- Sharpe PC, Duly EB, Macauley D, McCrum EE, Mulholland C, Stott G, et al. Total radical trapping antioxidant potential (TRAP) and exercise. *QJM* 1996; 89:223-8.
- Shepard RJ, Shek PN. Immune responses to inflammation and trauma: a physical training model. *Can J Physiol Pharmacol*. May; 76: 469-72, 1998.
- Smith JK, Dykes R, Douglas JE, Krishnaswamy G, Berk S. Long-term exercise and atherogenic activity of blood mononuclear cells in persons at risk of developing ischemic heart disease. *JAMA* 1999; 281:1722-7.
- Sprenger H, Jacobs C, Naim M, Gressner AM, Prinz H, Wesemann W, et al. Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long-distance running. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 63:188-95.
- Stammberger U, Gaspert A, Hillinger S, Vogt P, Odermatt B, Weder W, et al. Apoptosis induced by ischemia and reperfusion in experimental lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 2000; 69:1532-6.
- Starkie RL, Rolland J, Angus DJ, Anderson MJ, Febbraio MA. Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF- α levels after prolonged running. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280:769-74.
- Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Moller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1 α , IL-10 and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:433-7.

- Steimle CN, Guynn TP, Morganroth ML. Neutrophils are not necessary for ischemia-reperfusion injury of the lung. *Ann Thorac Surg* 1992; 53:64-73.
- Strieter RM, Kunkel SL, Showell HJ, Remick DG, Phan SH, Ward PA. Endothelial cell expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alfa, LPS, and IL-1 beta. *Science* 1989; 243:1467-9.
- Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, Totsuka M, Sato K, Sugawara K. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics. *Exerc Immunol Rev* 2002; 8:6-48.
- Tagawa T, Kozower BD, Kanaan SA, Daddi N, Suda T, Oka T, et al. Tumor necrosis factor inhibitor gene transfer ameliorates lung graft ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126:1147-54.
- Tasaka S, Hasegawa N, Ishizaka A. Pharmacology of acute lung injury. *Pulm Pharmacol Ther* 2002; 15:83-95.
- Terada LS, Dormish JJ, Shanley PF, Leff JA, Anderson BO, Repine JE. Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1992; 263:394-401.
- Tisi PV, Hulse M, Chulakadabba A, Gosling P, Shearman CP. Exercise training for intermittent claudication: does it adversely affect biochemical markers of the exercise-induced inflammatory response? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 14:344-50.
- Tonnessen T, Naess PA, Kirkeboe KA, Ilebekk A, Christensen G. Endothelin is released from the porcine coronary circulation after short-term ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22:313-6.
- Tsai BM, Wang M, March KL, Turrentine MW, Brown JW, Meldrum DR. Preconditioning: evolution of basic mechanisms to potential therapeutic strategies. *Shock* 2004; 21:195-209.
- Ullum H, Haahr PM, Diamant M, Palmo J, Halkjaer-Kristensen J, Pedersen BK. Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, or TNF-alpha pre-mRNA in BMNC. *J Appl Physiol* 1994; 77:93-7.

- Uthoff K, Zehr KJ, Lee PC. Neutrophil modulation results in improved pulmonary function after 12 and 24 hours of preservation. *Ann Thorac Surg* 1995; 59:7-13.
- Valenzuela A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci* 1991; 48:301-9.
- Van der Poll T, Smith SR, Swanson SW, Hack CE, Lowry SF. Effects of IL-10 on systemic inflammatory response during lethal primate endotoxemia. *J Immunol* 1997; 158:1971-5.
- Van Putte BP, Kesecioglu J, Hendriks JM, Persy VP, Van Marck E, Van Schil PE, et al. Cellular infiltrates and injury evaluation in a rat model of warm pulmonary ischemia-reperfusion. *Crit Care* 2005; 9:1-8.
- Van Otteren GM, Standiford TJ, Kunkel SL, Danforth JM, Strieter RM. Alterations of ambient oxygen tension modulate the expression of tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein-1alpha from murine alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13:399-409.
- Waldow T, Alexiou K, Witt W, Wagner FM, Guliemos V, Matschke K, et al. Attenuation of reperfusion-induced systemic inflammation by preconditioning with nitric oxide in an in situ porcine model of normothermic lung ischemia. *Chest* 2004; 125:2253-9.
- Wannamethee SG, Lowe GD, Whincup PH, Rumley A, Walker M, Lennon L. Physical activity and hemostatic and inflammatory variables in elderly men. *Circulation* 2002; 105:1785-90.
- Waxman K. Shock: ischemia, reperfusion and inflammation. *New Horizons* 1996; 4:153-60.
- Weinacker AB, Vaszar LT. Acute respiratory distress syndrome: physiology and new management strategies. *Ann Rev Med* 2001; 52:221-37.
- Weir EK, Archer SL, Reeves JT. **Nitric oxide and radicals in the pulmonary vasculature.** Armonk, Futura Publishing, 1996.
- Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991; 78:651-5.

- Welbourn R, Goldman G, Lobzik L, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, et al. Role of neutrophil adherence receptors (CD18) in lung permeability following lower torso ischemia. *Circ Res* 1992; 71:82-6.
- Werns SW, Lucchesi BR. Free radicals and ischemic tissue injury. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11:161-6.
- Wixson SK, Smiler KL. Anesthesia and analgesia in rodents. In: DF Kohn, SK Wixson, WJ White et al. (eds). **Anesthesia and analgesia in laboratory animals**. San Diego: Academic Press; 1997. p.165-203.
- Yeh FL, Shen HD, Fang RH. Deficient transforming growth factor beta and interleukin 10 responses contribute to the septic death of burned patients. *Burns* 2002; 28:631-7.
- Zapol WM, Rimar S, Gillis N, Marletta M, Bosken CH. Nitric oxide and the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:1375-80.
- Zhao G, AL Mehdi AB, Fischer AB Anoxia-reoxygenation versus ischemia in isolated rat lungs. *Am J Physiol* 1997; 273:1112-7.
- Zima T, Stipek S, Crkovska J, Nemecek K, Platenik J, Bartova V, et al. Antioxidant enzymes—superoxide dismutase and glutathione peroxidase—in haemodialyzed patients. *Blood Purif* 1996; 14:257-61.
- Zimmerman BJ, Grisham MB, Granger DN. Role of oxidants in ischemia/reperfusion-induced granulocyte infiltration. *Am J Physiol* 1990; 258:185-90.
- Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci* 1994; 307:284-92.

8- BIBLIOGRAFIA DE NORMATIZAÇÕES

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A. – **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4ªed., Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98 (alterada 2005).

9- ANEXOS

Anexo 1 – Planilhas das medidas avaliadas neste estudo.

EDEMA PULMONAR

pulmão esquerdo		
SHAM	IR/SED	IR/TREIN
33,3	348,8	335,1
60,6	314,1	339,6
49,1	378,6	304,4
67,8	364,8	443,8
66,0	516,8	404,1
66,4	441,8	
	476,0	
	417,9	

pulmão direito		
SHAM	IR/SED	IR/TREIN
24,3	192,5	110,3
35,9	217,5	68,4
40,0	134,8	92,1
57,4	139,1	142,9
76,3	190,7	75,6
82,8	142,9	
	123,8	
	190,0	

pulmão esquerdo + direito		
SHAM	IR/SED	IR/TREIN
57,6	541,3	445,4
96,5	531,6	408,0
89,1	513,4	396,5
125,2	503,9	586,7
142,3	707,5	479,7
149,2	584,7	
	599,8	
	607,9	

57,2	407,4	365,4
13,6	68,4	56,9
5,6	22,8	23,2
p=0,27 ns versus IR/SED		

52,8	166,4	97,9
23,4	35,0	29,9
9,5	11,7	12,2
p=0,004 versus IR/SED		

110,0	573,8	463,3
35,1	66,8	76,4
14,3	22,3	31,2
p=0,018 versus IR/SED		

MPO PULMONAR

pulmão esquerdo		
SHAM	IR/SED	IR/TREIN
12,9	21,5	19,5
8,1	38,7	35,9
21,4	13,9	16,7
14,1	29,6	24,3
	32,0	32,1
	26,8	32,8
	46,7	
	19,8	
	18,4	

pulmão direito		
SHAM	IR/SED	IR/TREIN
11,8	53,2	14,5
10,2	27,9	46,4
16,3	22,8	54,5
12,8	35,0	16,9
	24,1	40,0
	34,7	
	36,2	
	19,0	
	28,8	

SHAM	IR/SED	IR/TREIN			
12,9	11,8	21,5	53,2	19,5	14,5
8,1	10,2	38,7	27,9	35,9	46,4
21,4	16,3	13,9	22,8	16,7	54,5
14,1	12,8	29,6	35,0	24,3	16,9
		32,0	24,1	32,1	40,0
		26,8	34,7	32,8	
		46,7	36,2		
		19,8	19,0		
		18,4	28,8		

14,1	27,5	26,9
5,5	10,5	7,9
2,7	3,5	3,2
p=0,59 ns versus IR/SED		

12,8	31,3	34,5
2,6	10,1	17,9
1,3	3,4	7,3
p=0,08 ns versus IR/SED		

13,4	29,4	30,3
4,0	10,2	13,2
1,4	2,4	3,8
p=0,22 ns versus IR/SED		

TNF-alfa (SORO)

SHAM	IR/SED	IR/TREIN
4,1	0,6	11,9
8,2	4,5	9,0
0	18,7	0,6
0,0	13,2	4,5
9	24,3	3,3
1,7	15,3	17,0
	35,3	2,9
	21,3	23,4
	11,1	

Média	3,8	16,0	9,1
SD	4,0	10,5	7,9
SEM	1,2	2,9	2,3
		p<0,05 VS sham	p<0,05 VS IR/SED

IL-10

SHAM	IR/SED	IR/TREIN
409,0	269,5	628,7
644,1	814,2	387,6
706,9	477,0	626,7
564,4	376,8	432,5
515,8	899,1	254,7

Média	568,0	567,3	466,0
SD	115,2	275,8	161,4
SEM	51,5	123,3	72,2
		ns versus SHAM	ns versus SHAM IR/SED

IL-1beta

SHAM	IR/SED	IR/TREIN
25,386	46,164	28,44
27,408	36,621	36,052
27,922	43,702	31,62
	38,929	27,408
	30,546	24,397
	35,486	
	36,052	

Média	26,91	38,21	29,58
SD	1,34	5,28	4,44
SEM	0,77	2,00	1,99
		%	-22,59
		p=0,0047 versus SHAM	p=0,014 versus IR/SED
			ns versus SHAM

Peso corpóreo

IR/SED	IR/TREIN
465	375
375	335
375	335
435	325
425	405

média	415,00	355,00
SD	39,37	33,91
SEM	17,61	15,17
		p=0,032 versus IR/SED

Contagem de leucócitos circulantes

Sedentários

TOTAL	MONO	NE	EO
3,45	3,11	0,35	0,00
4,40	3,78	0,62	0,00
3,40	2,65	0,71	0,03
8,40	5,80	2,44	0,17
8,65	7,35	1,21	0,09

Média

SEM

5,66	4,54	1,06	0,06
1,18	0,89	0,37	0,03

Treinados

TOTAL	MONO	NE	EO
10,70	8,45	2,03	0,21
5,55	4,94	0,56	0,06
8,00	7,36	0,64	0,00
9,30	7,72	1,58	0,00

8,39	7,12	1,20	0,07
1,09	0,76	0,36	0,05

ns vs SED p=0,14 ns vs SED p=0,0697 ns vs SED p=0,8 ns vs SED p=0,087

Sedentários

TOTAL	MONO	NE	EO
17,05	14,83	2,22	0,00
19,80	12,28	7,13	0,40
14,10	12,13	1,90	0,07
16,80	14,28	2,44	0,08

16,94	10,70	2,74	0,11
1,04	2,73	1,18	0,07

Treinados

TOTAL	MONO	NE	EO
17,75	15,71	1,95	0,09
16,30	12,71	3,42	0,16
21,50	19,67	1,51	0,11
22,50	19,46	2,93	0,11
14,50	10,73	3,26	0,51
17,10	13,77	2,99	0,34
18,80	16,54	2,16	0,09
18,35	15,51	2,60	0,20
1,07	1,27	0,28	0,06

Anexo 2 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Experimental



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 746-1, sobre "AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA PÓS TREINAMENTO FÍSICO DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO PULMONAR NORMOTÉRMICA" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Ivan Felizardo Contrera Toro/Ricardo Kalaf Mussi está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 04 de novembro de 2004.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 746-1, entitled "_____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on November 4, 2004.

Campinas, 30 de janeiro de 2006.

2ª. VIA

Profa. Dra. Ana Maria A. Gueraldo
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP
CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Aloriso
Secretária

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CAMPUS UNIVERSITÁRIO ZILLACINO VAI
CEP - 13.081-870 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE 55 19 3789-4338
FAX 55 19 3389-5224