Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Bianca de Oliveira Saguie

Efeito do exercício físico moderado no reparo de lesões cutâneas em animais cronicamente estressados

Rio de Janeiro
2017

Bianca de Oliveira Saguie

Efeito do exercício físico moderado no reparo de lesões cutâneas em animais cronicamente estressados

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra. Andréa Monte Alto Costa

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S129 Saguie, Bianca de Oliveira.

Efeito do exercício físico moderado no reparo de lesões cutâneas em animais cronicamente estressados / Bianca de Oliveira Saguie – 2017.
69 f.

Orientadora: Andréa Monte Alto Costa

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Exercícios físicos - Teses. 2. Peles – Reparos e reconstrução – Teses. 3. Inflamação – Teses. 4.Estresse Fisiológico. I. Costa, Andréa Monte Alto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 613.72

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Bianca de Oliveira Saguie

Efeito do exercício físico moderado no reparo de lesões cutâneas em animais cronicamente estressados

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 16 de fevereiro de 2017.

Banca Examinadora:_____

Prof.ª Dra. Andréa Monte Alto Costa (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof. Dr. Gustavo Casimiro Lopes

Instituto de Educação Física e Desporto – UERJ

_____

Prof.ª Dra. Manuella Lanzetti Daher de Deus

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, meus avós e meu amor, meus grandes incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Há muito mais a agradecer do que pedir.

Agradeço a Deus e aos bons espíritos que me guiam e acompanham.

Aos meus pais Alberto Saguie e Denise Saguie por acreditarem no meu potêncial, me inspirarem diariamente com seus esforços e me darem as ferramentas necessárias para chegar até aqui.

Aos meus avós Eny Gomes, Glória Domett e Flavio Coelho (in memorian) pelo amor imensurável, carinho irrestrito e colo confortável nos momentos de angústia.

Ao meu amado Israel Gonçalves por ser meu grande parceiro de luz, me acompanhar e estimular, não me deixar esmorecer, me cativando com seu riso e suas sábias palavras.

À toda minha família por estarmos sempre unidos, por torcerem e celebrarem comigo cada passo nesta jornada.

À minha madrinha Suzana Pinheiro por ser minha grande amiga e por dividir comigo suas experiências.

Aos meus amigos, por compreenderem (na maior parte das vezes) minha ausência, não me julgarem por ser faltosa e ainda assim torcerem pelo meu sucesso.

À minha orientadora Andréa Monte Alto Costa, pela oportunidade, orientação e ensinamentos passados com paciência.

À professora Bruna Romana de Souza, pela grande paciência com minhas indagações, pelo ensinamento de bancada e todo trabalho duro.

À querida Rayssa pela companhia na confecção de grande parte deste trabalho de forma sempre extrovertida e alegre.

Às amigas Aline, Camila, Fernanda e Isabella, pela companhia do dia a dia, pela paciência para a lamúria coletiva e pelos risos bem vindos nas horas de desespero.

Aos amigos que o Laboratório de Reparo Tecidual me apresentou Eliana, Filipe, Jeanine, Luana, Marco, Raquel, Tatiana e Welker pela troca de experiências constantes, pela ajuda técnica e intelectual nas horas de dificuldade e pelas risadas frequentes.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para que eu chegasse até aqui.

Crê em ti mesmo, age e verás os resultados. Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar.

Chico Xavier

RESUMO

SAGUIE, Bianca de Oliveira. *Efeito do exercício físico moderado no reparo de lesões cutâneas em animais cronicamente estressados*. 2017. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

A inflamação prolongada induzida pelo estresse atrasa o reparo tecidual cutâneo. O exercício físico moderado pode inibir os efeitos adversos do estresse na pele através de um mecanismo anti-inflamatório. O objetivo desse estudo foi investigar o efeito do exercício moderado no reparo de lesões cutâneas de camundongos cronicamente estressados. Os camundongos foram treinados cinco vezes por semana na esteira ou não foram treinados. Em seguida foram submetidos ao estresse rotacional diário da 6ª semana até o dia da eutanásia. Na 8ª semana duas lesões excisionais totais foram criadas no dorso e coletadas 10 dias após, enquanto um grupo controle recebeu apenas as lesões. O exercício físico foi praticado simultaneamente ao estresse por duas semanas (ES+EXC) ou apenas previamente ao estresse (ES+EXP). Os resultados mostram que os níveis de normetanefrina plasmática estavam aumentados em todos os grupos estressados. Apenas o grupo ES+EXC potencializou esse efeito. O estresse atrasou a contração e re-epitelização da lesão, o grupo ES+EXC intensificou o atraso, e o grupo ES+EXP reverteu este efeito. O estresse atrasou a infiltração de neutrófilos e macrófagos no tecido de granulação tanto no grupo ES+SE quanto no grupo ES+EXC, mas esse efeito foi inibido pelo grupo ES+EXP. Todos os grupos estressados diminuíram a expressão de TNF-α no tecido de granulação. Dez dias após a lesão a quantidade de miofibroblastos estava aumentada no grupo ES+EXC, e reduzida no grupo ES+EXP. O estresse aumentou a expressão de TGF-β enquanto o grupo ES+EXC diminuiu, e o grupo ES+EXP apresentou valores semelhantes ao grupo controle. Os grupos estresse e ES+EXC diminuíram a síntese e alteraram a organização das fibras colágenas mas o grupo ES+EXP apresentou a mesma organização do grupo controle. O estresse aumentou a expressão de VEGF, enquanto ambos os grupos exercitados diminuíram. O estresse diminuiu a espessura da neo-epiderme, o grupo ES+EXC potencializou e o grupo ES+EXP inibiu este efeito. Em conclusão, o exercício moderado em associação ao estresse potencializa os efeitos deletérios do estresse atrasando o início da fase inflamatória, enquanto o exercício físico prévio ao estresse inibe este efeito.

Palavras chave: Exercício moderado. Estresse crônico. Inflamação. Reparo cutâneo.

ABSTRACT

SAGUIE, Bianca de Oliveira. *Effects of moderate physical exercise on cutaneous wound healing of chronically stressed animals.* 2017. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Prolonged stress-induced inflammation delays cutaneous tissue repair. The moderate physical exercise can inhibit the adverse effects of stress on the skin through an anti-inflammatory mechanism. The objective of this study was to investigate the effect of moderate exercise on the cutaneous wound healing of chronically stressed mice. Mice were trained five times a week on the treadmill or were not trained. The mice were submitted to daily rotational stress from the 6th week until the day of euthanasia. At the 8th week two total excisional wounds were created on the back and collected 10 days later. One control group received only the lesions. Physical exercise was practiced simultaneously to stress for two weeks (ES + EXC) or just prior to stress (ES + EXP). Plasma normetanephrine levels were increased in all stressed groups. The ES + EXC group potentiated this effect, but the ES + EXP group did not. Stress delayed the contraction and re-epithelialization of the lesion, the ES + EXC group potentiated the delay, and the ES + EXP group reversed. Stress delayed the infiltration of neutrophils and macrophages into the granulation tissue in both the ES + SE group and the ES + EXC group, but this effect was inhibited by the ES + EXP group. All stressed groups decreased TNF-α expression in the granulation tissue. Ten days after injury the amount of myofibroblasts was increased in the ES + EXC group, and reduced in the ES + EXP group. Stress increased the expression of TGF-β while ES + EXC group decreased, and the ES + EXP group presented Values similar to the control group. The stress and ES + EXC groups diminished the synthesis and altered organization of the collagen fibers, but the ES + EXP group presented the same organization as the control group. Stress increased the expression of VEGF, while both exercise groups decreased. Stress decreased neo-epidermal thickness, ES + EXC group potentiated, and ES + EXP group inhibited this effect. In conclusion, moderate exercise in association with stress enhances the deleterious effects of stress by delaying the onset of the inflammatory phase, whereas physical exercise prior to stress inhibits this effect.

Keywords: Moderate exercise. Chronic stress. Inflammation. Skin repair.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Síntese dos acontecimentos e duração do reparo tecidual cutâneo..... 20

Figura 2 - Processo de produção de citocinas inflamatórias no estresse crônico.... 25

Figura 3 - Desenho experimental..... 34

Figura 4 - Níveis de lactato sanguíneo durante o modelo experimental..... 42

Figura 5 - Efeito do exercício e estresse nos níveis de normetanefrina..... 42

Figura 6 - Efeito do exercício concomitante ou prévio e do estresse na contração e reepitelização de lesões..... 44

Figura 7 - Efeito do exercício e estresse na espessura da neoepiderme..... 46

Figura 8 - Efeito do exercício e estresse na infiltração de neutrófilos..... 48

Figura 9 - Efeito do exercício e estresse na infiltração de macrófagos e expressão de TNF-α na lesão..... 49

Figura 10 - Efeito do exercício e estresse na diferenciação miofibroblástica e angiogenese..... 51

Figura 11 - Efeito do exercício e estresse na deposição de matriz extracelular..... 53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
BCA	Ácido bicinconínico
CSF	Fator estimulante de colônia
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HSV	Virus da herpes simplex
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF	Interferon
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
KC	Quimioatrativo de queratinócitos
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
MCP	Proteína quimioatrativa de monócito
MIP	Proteína inflamatória de macrófago
MMPs	Metaloproteinases
MPO	Mieloperoxidase
PBS	Tampão salina fosfato
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TGF	Fator de crescimento transformante
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
Vv	Densidade de volume
α-SMA	alfa-actina de músculo liso

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	**REPARO TECIDUAL CUTÂNEO**	16
2	**ESTRESSE CRÔNICO**	21
3	**EXERCÍCIO FÍSICO**	26
4	**OBJETIVOS**	28
4.1	**Geral**	28
4.2	**Específicos**	28
5	**MATERIAL E MÉTODOS**	29
5.1	**Animais**	29
5.2	**Modelo de exercício**	29
5.3	**Modelo de estresse crônico**	30
5.4	**Modelo de lesão**	30
5.5	**Desenho experimental**	31
5.6	**Níveis sanguíneos de lactato**	34
5.7	**Análises macroscópicas**	34
5.8	**Sacrifício e coleta das amostras**	35
5.9	**Níveis plasmáticos de normetanefrina**	35
5.10	**Análises histológicas**	36
5.11	**Espessura da neoepiderme**	36
5.12	**Imunohistoquímica**	37
5.13	**Níveis de hidroxiprolina**	38
5.14	**Imunoblotting**	39
5.15	**Técnica de ELISA**	40
5.16	**Análises estatísticas**	40
6	**RESULTADOS**	41

6.1 **Indução de exercício moderado**..... 41

6.2 **Indução de estresse**.....…..... 41

6.3 **Macroscopia, contração e reepitelização**..... 43

6.4 **Aspecto geral do tecido e espessura da neoepiderme**..... 45

6.5 **Infiltração de neutrófilos**..... 47

6.6 **Infiltração de macrófagos e inflamação**..... 47

6.7 **Diferenciação miofibroblástica e angiogenese**..... 50

6.8 **Deposição de matriz extracelular**..... 52

7 **DISCUSSÃO**..... 54

CONCLUSÃO..... 60

REFERÊNCIAS..... 61

ANEXO A – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética para Cuidado e Uso de Animais Ex-perimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG-UERJ)..... 67

ANEXO B – Planilha detalhada do exercício físico..... 68

ANEXO C – Artigo submetido..... 69

INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo e desempenha diversas funções no organismo, destacam-se a função de barreira física protetora e termogênese (MARTIN, 1997; SINGER e CLARK, 1999; GANTWERKER e HOM, 2011; SINNO e PRAKASH, 2013; SUN *et al.*, 2014). Por conta da sua importância para manutenção do organismo é essencial que a integridade da pele seja mantida. Assim, a quebra da continuidade da pele representa uma lesão que deve ser reparada.

O processo normal de reparo da pele é dinâmico e bem orquestrado, entretanto pode ser alterado por diversos fatores (BROUGHTON *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2014). Vários trabalhos já demonstraram que o estresse crônico retarda o reparo tecidual, uma vez que atrasa o início da fase inflamatória, e apresenta uma exacerbação e prolongamento da mesma (MARUCHA *et al.*, 1998; ROMANA-SOUZA *et al.*, 2010; DE ALMEIDA *et al.*, 2013; ROSA *et al.*, 2014; BANDEIRA *et al.*, 2015).

Por isso, muitos trabalhos têm buscado alternativas e tratamentos para atenuar os efeitos deletérios do estresse no reparo tecidual como a suplementação com óleos comestíveis, triptofano e erva mate (ROSA *et al.*, 2014; BANDEIRA *et al.*, 2015; ROMANA-SOUZA, PIRES*, et al.*, 2015). Já foi descrito que o exercício físico induz um perfil anti-inflamatório (KOHUT *et al.*, 2006; KEYLOCK *et al.*, 2008), e pode acelerar o reparo de lesões na pele de camundongos C57/BL6 (ZOGAIB e MONTE-ALTO-COSTA, 2011), animais idosos (KEYLOCK *et al.*, 2008) e camundongos alimentados com dieta high fat (PENCE *et al.*, 2012). Sendo assim, o exercício físico poderia atuar no reparo tecidual de animais cronicamente estressados. Entretanto uma vez que o exercício físico também é uma forma de estresse, a sobreposição ou não de exercício e estresse pode apresentar efeitos distintos. Por conta disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do exercício físico concomitante ou prévio ao estresse crônico no reparo tecidual cutâneo.

1 **REPARO TECIDUAL CUTÂNEO**

O reparo tecidual é um processo complexo e dinâmico, necessário para a manutenção da homeostase do organismo, após uma lesão, caracterizado por uma série de interações e reações entre células, mediadores e matriz extracelular (MARTIN, 1997; SINGER e CLARK, 1999; BROUGHTON *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2007; GANTWERKER e HOM, 2011; SINNO e PRAKASH, 2013; CHESTER e BROWN, 2016). Além disso, o reparo tecidual pode ser dividido didaticamente em quatro fases distintas que se sobrepõe: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento (SUN *et al.*, 2014; CHESTER e BROWN, 2016; LANDEN *et al.*, 2016). O objetivo final da cascata de reparo tecidual é reestabelecer a homeostase substituindo o tecido lesionado por um tecido mecanicamente e estruturalmente semelhante ao fisiológico, a cicatriz (CHESTER e BROWN, 2016).

A primeira fase do reparo tecidual é a hemostasia, que consiste em dois processos majoritários: o desenvolvimento do coágulo de fibrina e a coagulação propriamente dita (LI *et al.*, 2007). A lesão rompe vasos sanguíneos levando ao extravasamento de constituintes do sangue (SINGER e CLARK, 1999). A hemorragia inicial expõe o tecido conjuntivo subendotelial altamente trombogênico para as plaquetas (GANTWERKER e HOM, 2011), que são ativadas por proteínas da matriz, como colágeno e fibronectina, presentes na parede vascular (LI *et al.*, 2007). A ativação das mesmas leva à adesão e agregação, assim como à liberação de mediadores (LI *et al.*, 2007). As plaquetas são então incorporadas por uma matriz provisória composta de fibrina, fibrinogênio e fibronectina reticulados (CHESTER e BROWN, 2016). Além de preencher o leito da lesão, o coágulo servirá como matriz provisória, provendo um arcabouço para migração de diversos tipos celulares (SINGER e CLARK, 1999; LANDEN *et al.*, 2016), e concentrará citocinas e fatores de crescimento no local da lesão (BROUGHTON *et al.*, 2006; SINNO e PRAKASH, 2013). Além disso, ao serem ativadas, as plaquetas ativam a cascata de coagulação (vias intrínseca e extrínseca) (BROUGHTON *et al.*, 2006; GANTWERKER e HOM, 2011). Adicionalmente as membranas celulares das células que foram lesadas liberam vasoconstritores potentes para reduzir a perda de sangue (BROUGHTON *et al.*, 2006; SINNO e PRAKASH, 2013). As plaquetas são essenciais para essa fase, pois elas não só promovem a hemostasia inicial, como secretam várias citocinas, hormônios e quimiocinas que

induzem o influxo de células inflamatórias para o leito da lesão (GANTWERKER e HOM, 2011). Entretanto, na ausência de hemorragia, as plaquetas não são essenciais para o reparo, uma vez que diversos mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos são gerados por vias complementares e por células parenquimais danificadas ou ativas (SINGER e CLARK, 1999).

A degranulação das plaquetas ativa a cascata complemento e libera fatores atrativos para neutrófilos que, junto com produtos bacterianos e outros fatores, atraem os neutrófilos para a área da lesão, o que dá início à fase inflamatória (SINGER e CLARK, 1999; BROUGHTON *et al.*, 2006; GURTNER *et al.*, 2008; SINNO e PRAKASH, 2013; CHESTER e BROWN, 2016). O recrutamento dos neutrófilos inicia a limpeza dos debris celulares e a fagocitose de agentes infecciosos (MARTIN, 1997; SINGER e CLARK, 1999; BROUGHTON *et al.*, 2006; SINNO e PRAKASH, 2013). Se o estímulo para a infiltração neutrofílica não persistir, os neutrófilos serão exudados ou fagocitados pelos macrófagos (MARTIN, 1997; SINGER e CLARK, 1999; SINNO e PRAKASH, 2013).

Em resposta a quimioatrativos específicos como: fragmentos proteicos de matriz extracelular, fator de crescimento transformante beta (TGF-β), proteína quimioatrativa de monócito 1 (MCP-1) e alterações moleculares na superfície de células endoteliais de capilares da área da lesão, os monócitos invadem a lesão e se diferenciam em macrófagos (MARTIN, 1997; SINGER e CLARK, 1999; LI *et al.*, 2007; GURTNER *et al.*, 2008; SINNO e PRAKASH, 2013). Os macrófagos continuam a limpeza do leito da lesão, através da fagocitose (MARTIN, 1997; SINNO e PRAKASH, 2013; CHESTER e BROWN, 2016). Além disso, os macrófagos secretam diversas citocinas e fatores de crescimento necessários para o reparo tecidual (MARTIN, 1997; SINGER e CLARK, 1999; BROUGHTON *et al.*, 2006; SINNO e PRAKASH, 2013; CHESTER e BROWN, 2016). A interação dos macrófagos com a matriz extracelular estimula que os mesmos expressem fator estimulante de colônia 1 (CSF-1), necessário para a sobrevivência destas células, fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), uma potente citocina inflamatória, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), um importante quimioatrativo e mitógeno para fibroblastos, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que estimula a angiogenese, TGF- β que faz a quimiotaxia de macrófagos e fibroblastos para o local da lesão, entre outras substâncias (SINGER e CLARK, 1999; EMING *et al.*, 2010; SINNO e PRAKASH, 2013). Além disso, os macrófagos expressam interleucina-1β (IL-1β), IL-6, IL-10,

fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), TGF-α, fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) entre outros (SINGER e CLARK, 1999; EMING *et al.*, 2010). A inflamação é essencial para o reparo, e a inibição ou prolongamento desta fase pode resultar no comprometimento de todo o processo (GANTWERKER e HOM, 2011).

A liberação de fatores de crescimento pelos macrófagos estimula os eventos que caracterizam a fase proliferativa. Esta fase é marcada pela proliferação e migração de diversos tipos celulares (GURTNER *et al.*, 2008). Alguns eventos desta fase são a fibroplasia, angiogênese, re-epitelização e formação do tecido de granulação (BROUGHTON *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2007; GANTWERKER e HOM, 2011; SINNO e PRAKASH, 2013). A fibroplasia é o processo de proliferação e migração do fibroblasto para o coágulo de fibrina e a deposição de proteínas no espaço extracelular que irão constituir a nova matriz (LI *et al.*, 2007). Os fibroblastos dos arredores são estimulados por PDGF, TGF-β e fator de crescimento fibroblástico (FGF), secretados majoritariamente pelos macrófagos, a proliferar, migrar para o leito da lesão e depositar colágeno, fibrina, fibronectina, ácido hialuronico, entre outras proteínas para reconstituir a matriz extracelular (SINGER e CLARK, 1999; SINNO e PRAKASH, 2013; CHESTER e BROWN, 2016).

Além disso, a expressão de TGF-β1 pelos macrófagos induz a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos (BROUGHTON *et al.*, 2006). Os miofibroblastos possuem filamentos de actina citoplasmáticos similares aos encontrados em células musculares lisas, e possuem a habilidade de se contrair (GABBIANI *et al.*, 1971; LI *et al.*, 2007). Esta característica confere aos miofibroblastos o papel de principais mediadores da contração da lesão (GABBIANI *et al.*, 1971; LI *et al.*, 2007). A contração minimiza o trabalho para reepitelizar a lesão, uma vez que aproxima os bordos da mesma, diminuindo a área sem epiderme (MARTIN, 1997). Esse evento envolve uma complexa interação entre células, matriz celular e citocinas (SINGER e CLARK, 1999). A contração é unificada e requer comunicação célula-célula e célula-matriz (LI *et al.*, 2007). Os pseudópodos dos miofibroblastos se estendem e a actina citoplasmática dos miofibroblastos se liga à fibronectina extracelular, aderem às fibras de colágeno e retraem, produzindo a contração da lesão (LI *et al.*, 2007).

A angiogenese consiste na formação de novos vasos a partir de outros pré-existentes (LI *et al.*, 2007). Diversos fatores estimulam este evento, como a baixa tensão de oxigênio e a liberação de VEGF por diversas células presentes na lesão

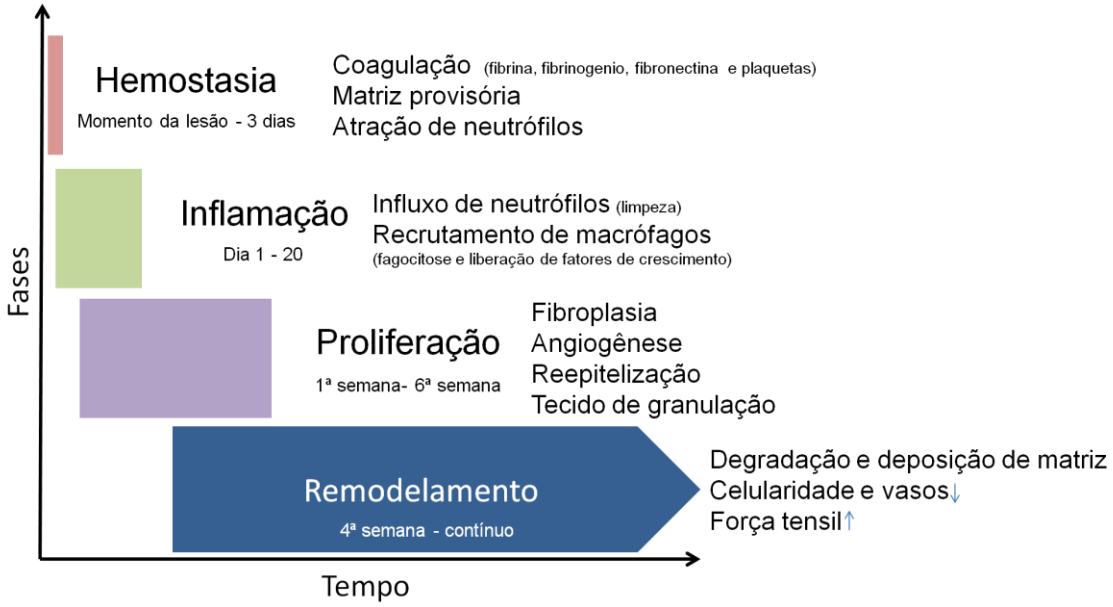
(plaquetas, neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, células epidérmicas) (LI *et al.*, 2007; SINNO e PRAKASH, 2013). As células endoteliais estimuladas proliferam e migram em direção ao leito da lesão através da digestão enzimática da membrana basal e da projeção de pseudópodes, formando estruturas tubulares (LI *et al.*, 2007). Esse processo é necessário para mediar trocas gasosas e transportar os nutrientes para sustentar o metabolismo celular do sítio de lesão (SINGER e CLARK, 1999; SINNO e PRAKASH, 2013).

A reepitelização é o processo através do qual os queratinócitos das margens da lesão são estimulados a proliferar e migrar em direção ao centro da lesão reestabelecendo uma nova epiderme, chamada de neo-epiderme (LI *et al.*, 2007). Esse estímulo é feito através da secreção de fator de crescimento epidérmico (EGF) e TGF-α secretados pelos macrófagos e plaquetas (BROUGHTON *et al.*, 2006). Além disso, a expressão de IL-1 e TNF-α induz o aumento da expressão gênica de fator de crescimento de queratinócitos (KGF) pelos fibroblastos, que respondem liberando KGF-1 e 2 e IL-6, que estimulam os queratinócitos vizinhos a migrarem para o local da lesão, proliferarem e se diferenciarem (BROUGHTON *et al.*, 2006). Os queratinócitos migram a partir dos bordos da lesão digerindo a matriz extracelular com proteases até reestabelecerem a camada basal (GANTWERKER e HOM, 2011). Além disso, células indiferenciadas do interior do bulbo dos folículos pilosos e glândulas apócrinas funcionam como células tronco, diferenciam-se em queratinócitos e participam da reepitelização (GANTWERKER e HOM, 2011).

A fase de remodelamento é caracterizada pela substituição do tecido de granulação rico em colágeno tipo III por uma cicatriz rica em colágeno tipo I e com poucas células e poucos vasos (LI *et al.*, 2007; GANTWERKER e HOM, 2011). O colágeno tipo III, que é inicialmente depositado na matriz extracelular é menos espesso que o colágeno da pele sã, e é orientado paralelamente à lesão (BROUGHTON *et al.*, 2006). O remodelamento de colágeno durante a transição de tecido de granulação para cicatriz depende da síntese e catabolismo contínuos (SINGER e CLARK, 1999). O processo de conversão do colágeno da derme é atribuído ao *turnover* do colágeno, mediado pela ação das metaloproneinases (MMPs) (SINGER e CLARK, 1999; BROUGHTON *et al.*, 2006). As MMPs não são detectáveis ou estão em níveis muito reduzidos no tecido saudável, e são induzidas durante o processo de reparo em resposta a citocinas, fatores de crescimento e adesão célula-matriz (LI *et al.*, 2007). Conforme aumenta a quantidade de colágeno tipo I depositado na cicatriz,

aumenta também a força tensil da cicatriz (GANTWERKER e HOM, 2011). Com o reparo da lesão, a celularidade no local começa a diminuir através da apoptose de miofibroblastos e células vasculares (DESMOULIERE *et al.*, 1995). Por ser um processo dinâmico e bem orquestrado por diversas células e mediadores, diversos fatores podem alterar o processo normal de reparo da pele (BROUGHTON *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2014). Na figura 1 pode-se observar uma figura esquemática com as fases do reparo tecidual e seus principais eventos (Figura 1).

Figura 1 – Síntese dos acontecimentos e duração do reparo tecidual cutâneo



Fonte: A autora, 2016.

2 **ESTRESSE CRÔNICO**

Estresse é definido como o processo através do qual as demandas do ambiente excedem a capacidade do indivíduo de lidar, resultando em alterações afetivas, comportamentais e fisiológicas (VILEIKYTE, 2007). Além disso, estresse pode ser definido também como ao estado de ameaça ou percebida ameaça que leva às mudanças fisiológicas que perturbam a homeostase (CHARMANDARI *et al.*, 2005; CHROUSOS, 2009). Homeostase por sua vez representa a manutenção de condições quase constantes no meio interno, ou seja, o equilíbrio do organismo.

Sendo assim, a perturbação da homeostase leva a diversas adaptações do organismo. Se essas adaptações são inadequadas, excessivas ou prolongadas, podem gerar efeitos adversos graves nas funções fisiológicas vitais (CHARMANDARI *et al.*, 2005; CHROUSOS, 2009). O estresse desencadeia a liberação de sinais neuroendócrinos pelo sistema nervoso, o que pode afetar a resposta imune (WEBSTER MARKETON e GLASER, 2008). As principais, embora não únicas, vias neuroendócrinas ativadas em resposta ao estresse são o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal que resulta no aumento da secreção de glicocorticoides e o sistema nervoso simpático que estimula à medula adrenal a secretar catecolaminas, epinefrina e norepinefrina (CHARMANDARI *et al.*, 2005; WEBSTER MARKETON e GLASER, 2008; NICOLAIDES *et al.*, 2015). A exposição aguda aos glicocorticoides e catecolaminas inibe a inflamação (TIAN *et al.*, 2014). Isto ocorre através da ativação de receptores específicos das células imunes que culmina na diminuição da liberação de citocinas pró inflamatórias e aumento da liberação de citocinas anti-inflamatórias (TIAN *et al.*, 2014). Entretanto a exposição crônica a altos níveis de glicocorticoides e catecolaminas pode ser prejudicial e predispor a problemas neurológicos, psiquiátricos, cardiovasculares, metabólicos e imunológicos (CHROUSOS, 2009). O estresse crônico, ao contrário da exposição aguda, induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TIAN *et al.*, 2014). A figura 2 representa as principais vias ativadas pelo estresse agudo e crônico.

Já foi descrito que o estresse crônico aumenta a vulnerabilidade à deposição de gordura abdominal, estresse oxidativo e risco metabólico associados à dieta (ASCHBACHER *et al.*, 2014). Sabe-se também que o estresse repetido diário em camundongos desencadeia o aumento da pressão sanguínea, o aumento das célu-

las T circulantes e a sua infiltração vascular, assim como aumenta os níveis de ansiedade (MARVAR *et al.*, 2012). Adicionalmente, já se sabe que em pacientes submetidos a estresse psicológico (por exemplo depressão) há uma maior associação de desenvolvimento de doenças inflamatórias comórbidas como diabetes, câncer, e doença cardíaca do que na população em geral (IWATA *et al.*, 2013).

Uma meta-análise de mais de 300 estudos sobre estresse crônico, mostrou que em humanos há o aumento da produção de IL-6 e interferon-γ (INF-γ) durante o estresse quando comparados aos grupos controles (SEGERSTROM e MILLER, 2004). Além disso, o estresse crônico aumenta o número de neutrófilos circulantes comparado com o momento prévio ao estresse em ratos (BOWERS *et al.*, 2008). O estresse crônico rotacional pode também aumentar os níveis proteicos de TNF-α no plasma e na pele de camundongos (ROMANA-SOUZA, LIMA-CEZAR*, et al.*, 2015). Já foi demonstrado que o estresse psicológico crônico é associado ao aumento da concentração de biomarcadores inflamatórios no sangue humano, como IL-6 (KIECOLT-GLASER *et al.*, 2005). Sabe-se também que o estresse psicológico agudo pode inibir a recuperação da função de barreira da pele em seres humanos (ALTEMUS *et al.*, 2001), além de acelerar o envelhecimento da pele em camundongos (ROMANA-SOUZA, LIMA-CEZAR*, et al.*, 2015). Sabe-se que o estresse crônico induz ao aumento do dano oxidativo, assim como aumenta a infiltração de neutrófilos e a liberação de enzimas proteolíticas na pele de camundongos (ROMANA-SOUZA, LIMA-CEZAR*, et al.*, 2015). Um estudo realizado com humanos observou que no dia da realização de uma lesão cutânea, os pacientes com maiores níveis de estresse percebido apresentavam menos macrófagos na pele do que os pacientes com menores níveis de estresse (KOSCHWANEZ *et al.*, 2015). Já está bem descrito na literatura que o estresse crônico atrasa o reparo tecidual (MARUCHA *et al.*, 1998; PADGETT *et al.*, 1998; GOUIN *et al.*, 2008; ROMANA-SOUZA *et al.*, 2009; ROMANA-SOUZA *et al.*, 2010; DE ALMEIDA *et al.*, 2013; ROSA *et al.*, 2014; BANDEIRA *et al.*, 2015; ROMANA-SOUZA, PIRES*, et al.*, 2015).

Gouin e colaboradores observaram que em humanos que não controlavam a raiva, o reparo de lesões era retardado, e isso provavelmente acontecia pelos altos níveis de cortisol decorrentes do estresse (GOUIN *et al.*, 2008). Um experimento realizado com estudantes demonstrou que lesões orais fechavam 40% mais devagar no período de provas do que nas férias de verão (MARUCHA *et al.*, 1998). Mostrou também que há uma diminuição de IL-1 24 horas depois da lesão, o que é prejudici-

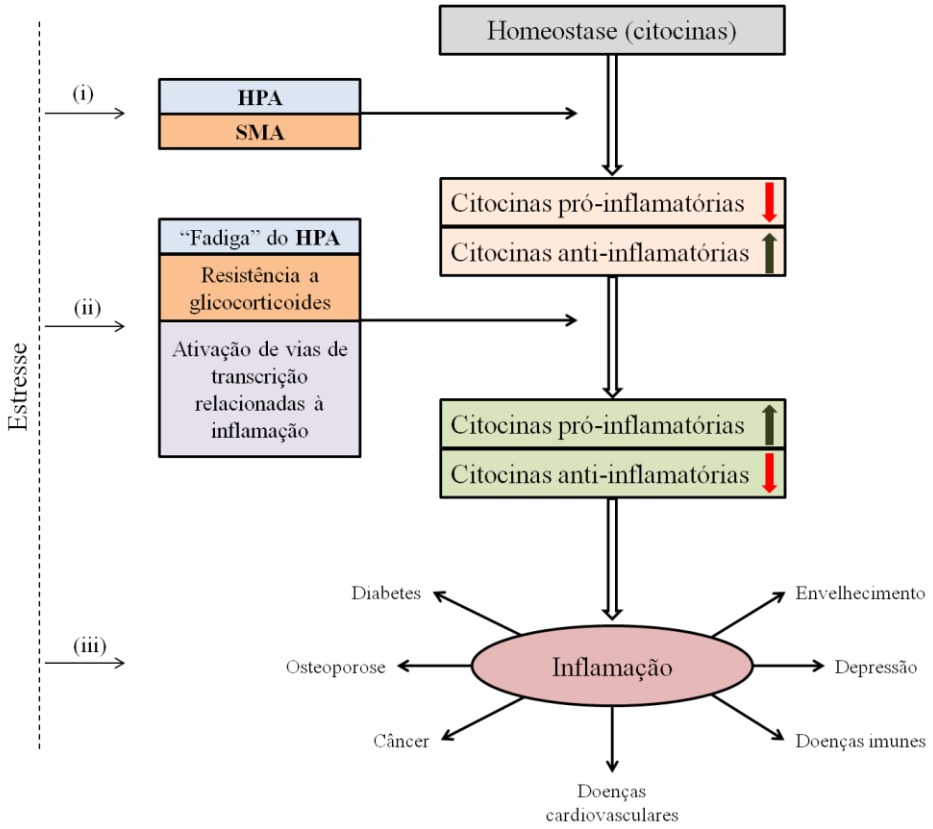
al, uma vez que essa citocina é extremamente importante para a adesão de moléculas ao endotélio e ativação dos fibroblastos que produzem fatores de crescimento (MARUCHA *et al.*, 1998). Outro estudo mostra que mesmo uma única discussão conjugal de meia hora em um ambiente de laboratório pode diminuir os níveis de IL-6, IL-1β e TNF-α nas primeiras 24 horas depois da briga; e que brigas a longo prazo retardam em 60% o fechamento da lesão quando comparados a casais pouco hostis (KIECOLT-GLASER *et al.*, 2005). Já se sabe que o estresse por contenção em camundongos prolonga o tempo de fechamento da lesão, além de diminuir a celularidade no sítio da lesão nos dias 1 e 3 após a lesão (PADGETT *et al.*, 1998). Além disso, aumenta a infiltração neutrofílica 3 e 5 dias após a lesão (GAJENDRAREDDY *et al.*, 2013; TYMEN *et al.*, 2013) assim como a expressão dos genes proteína inflamatória de macrófago-2 (MIP-2) e quimioatrativo de queratinócitos (KC) cinco dias após a lesão (TYMEN *et al.*, 2013).

Em 2009 observou-se que os altos níveis de epinefrina também levavam à migração atrasada dos queratinócitos, assim como reepitelização prejudicada em modelo de queimadura em explantes de pele humana através de receptores β2 adrenérgicos (SIVAMANI *et al.*, 2009). Romana-Souza e colaboradores observaram que o aumento da liberação de catecolaminas causado pelo estresse rotacional retarda o reparo de lesões excisionais cutâneas de camundongo e atrasa a infiltração de neutrófilos e macrófagos no local da lesão quando comparados a animais não estressados (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2009). Outro estudo demonstrou que o estresse rotacional também atrasa a liberação de TNF-α e diminui a deposição de colágeno no sítio da lesão quando comparados ao controle (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2010). Além disso, *in vitro* a atividade de fibroblastos dermais de camundongos neonatos é alterada pelos altos níveis de epinefrina via receptores β-adrenérgicos, mas não via receptores α-adrenérgicos (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2009). Outro trabalho demonstrou que o estresse rotacional diminui a expressão de TGF-β na área de lesão 14 dias após a lesão quando comparado ao grupo controle (DE ALMEIDA *et al.*, 2013). Já foi descrito também que os hormônios sexuais também exercem papel no reparo de lesões de animais estressados (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2014). Além disso, já se sabe que o estresse rotacional aumenta os níveis de VEGF e diminui a densidade de volume de vasos sanguíneos na área da lesão, 14 dias após a lesão quando comparado ao grupo controle (ROSA *et al.*, 2014). Sabe-se que o estresse crônico aumenta o dano oxidativo no tecido de granulação 10 dias após a lesão

quando comparado ao grupo controle (ROMANA-SOUZA, PIRES*, et al.*, 2015). Já foi demonstrado que 5 dias após a lesão há um aumento da expressão de MCP-1 na lesão de animais estressados por contenção quando comparado ao grupo controle (BANDEIRA *et al.*, 2015).

Por conta disso, muitos estudos vêm propondo novas terapias como o uso de bloqueadores β-adrenérgicos, a suplementação com óleos comestíveis e triptofano para atenuar os efeitos deletérios do estresse crônico no reparo de lesões cutâneas (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2010; ROSA *et al.*, 2014; BANDEIRA *et al.*, 2015; ROMANA-SOUZA, PIRES*, et al.*, 2015). Na figura 2 pode-se observar uma figura esquemática dos eixos adaptativos ativados pelo estresse agudo e a evolução para estresse crônico (Figura 2).

Figura 2 – Processo de produção de citocinas inflamatórias no estresse crônico



Legenda: (i) O agente estressor interrompe a homeostase de citocinas através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e eixo sinstema nervoso simpático-medula adrenal (SMA) o que promove a liberação de glicocorticoides e catecolaminas respectivamente, estes inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e induzem à liberação de citocinas anti-inflamatórias.(ii) A exposição contínua ao agente estressor aumenta a liberação das citocinas próinflamatórias e diminui a liberação das citocinas anti-inflamatórias através da: fatiga do eixo HPA; resistência aos glicocorticóides; ativação de vias de transcrição relacionadas à inflamação(iii) O estresse crônico contínuo aumenta a liberação de citocinas pró-inflamatórias, o que induz à uma resposta inflamatória que pode causar diversas doenças. Adaptado de (TIAN *et al.*, 2014)

Fonte: A autora, 2016.

3 **EXERCÍCIO FÍSICO**

Atualmente muito tem se falado sobre a importância e benefícios do exercício físico, o que torna sua prática crescente mundialmente. Acredita-se que o exercício físico promova a melhora da memória e há uma consistente associação entre altos níveis de aptidão e atividade física com maior volume do córtex pré-frontal e hipocampo de adultos mais velhos (ERICKSON *et al.*, 2014). Adicionalmente, o exercício aeróbio de baixa ou alta intensidade e duração pode melhorar o perfil lipoproteico, estimulando o melhor funcionamento dos processos enzimáticos envolvidos no metabolismo lipídico, favorecendo aumento da lipoproteína de alta densidade (HDL) e modificando a composição da lipoproteína de baixa densidade (LDL), tornando essas moléculas menos aterogênicas (ARQUER *et al.*, 2006).

O exercício pode também atenuar o aumento do estresse oxidativo relacionado a idade, podendo por esta razão retardar o aparecimento da imunossenescência (SIMPSON *et al.*, 2012). Sabe-se também que tanto o exercício físico agudo quanto o crônico são capazes de melhorar a resposta imune para vacinação, particularmente nos indivíduos com respostas sub-ótimas à vacinação (PASCOE *et al.*, 2014). Animais treinados por oito semanas de corrida submetidos à infecção com vírus herpes simplex-1 (HSV-1), apresentam maiores níveis de IFN-γ, IL-2 e IL-10 (KOHUT *et al.*, 2004). Já foi demonstrado que o treino aeróbico de baixa intensidade prévio de seis semanas é capaz de inibir a inflamação neutrofílica em pulmões induzida por lipopolissacarídeo (LPS) (RAMOS *et al.*, 2010). O exercício físico aeróbico pode diminuir as citocinas inflamatórias plasmáticas, como o IL-6, sem depender dos receptores adrenérgicos (KOHUT *et al.*, 2006).

O exercício físico é capaz de acelerar o reparo de lesões em animais idosos (KEYLOCK *et al.*, 2008), em obesos induzidos por dieta high-fat (PENCE *et al.*, 2012), e camundongos C57/BL6 (ZOGAIB e MONTE-ALTO-COSTA, 2011). A corrida de baixa intensidade prévia por 4 semanas e a sua continuidade por mais duas semanas é capaz de acelerar o fechamento da lesão em ratos quando comparado à animais sedentários (ZHOU *et al.*, 2016). Em adultos mais velhos o condicionamento prévio de um mês com exercício físico aeróbico e a continuidade de sua prática após uma lesão, é capaz de acelerar o reparo de lesões quando comparado à pessoas sedentárias (EMERY *et al.*, 2005). Isso ocorre por vários fatores envolvidos nas

diversas fases do reparo, como liberação de quimiocinas, quimioatrativos, migração e proliferação celular. O exercício físico pode diminuir os níveis de TNF-α, KC e MCP-1 nos primeiros dias após uma lesão em animais idosos quando comparados ao grupo sedentário (KEYLOCK *et al.*, 2008). Além disso, sabe-se que há uma diminuição da produção de TNF-α pelos macrófagos isolados de ratos condicionados por natação durante 12 semanas (TERRA *et al.*, 2013). A diminuição dessas quimiocinas exibe um quadro anti-inflamatório e a modulação da inflamação pode ser benéfica para o reparo de lesões. Já foi demonstrado que a corrida moderada por 6 semanas aumenta a deposição de colágeno na área da lesão 14 dias após a lesão em camundongos C57BL/6 (ZOGAIB e MONTE-ALTO-COSTA, 2011).

Além disso, existem indícios de que o exercício físico é capaz de inibir ou atenuar efeitos deletérios de quadros envolvidos com o estresse psicológico. Por exemplo: um estudo mostrou que a prática de 30 minutos de pedalada pode reduzir a pressão arterial de professores universitários durante todo o dia após o exercício quando comparados aos professores sedentários (RIBEIRO *et al.*, 2011). Além disso, pacientes que fazem caminhadas diárias demonstram uma redução no estresse percebido, na Escala de Depressão e Ansiedade de Beck e aumento de humor positivo no final do treino (HOPKINS *et al.*, 2012). Sabe-se que a natação moderada concomitante ao estresse repetido por imobilização durante sete dias é capaz de reverter o aumento da permeabilidade intestinal quando comparado ao grupo somente estressado (LUO *et al.*, 2014). O condicionamento físico por 7 semanas de corrida inibe o aumento dos níveis circulantes de TNF-α e IL-6 induzido pela privação de sono total em ratos, embora os níveis circulantes de corticoesterona, epinefrina e norepinefrina serem semelhantes aos do grupo sedentário (CHENNAOUI *et al.*, 2015).

Juntos, esses estudos indicam que o exercício aeróbico moderado possui efeitos anti-inflamatórios, através da modulação da inflamação. Há também indicativos de que o exercício tenha influência em condições de estresse crônico. Estresse esse que por sua vez é caracterizado por retardar o início da fase inflamatória, prolongando-a e exacerbando-a, levando à danos no reparo tecidual. Sendo assim, a hipótese deste trabalho foi de que o exercício físico moderado é capaz de reverter ou atenuar os efeitos danosos do estresse crônico, através da modulação da resposta inflamatória.

4 **OBJETIVOS**

4.1 **Geral**

Avaliar os efeitos do exercício físico moderado no reparo de lesões excisionais totais de camundongos cronicamente estressados.

4.2 **Específicos**

a) Medir o fechamento da lesão de animais estressados submetidos ou não ao condicionamento físico anterior à lesão;
b) Medir e medir a espessura da neoepiderme;
c) Quantificar o número de macrófagos e neutrófilos na área da lesão;
d) Mensurar a densidade de volume de miofibroblastos e vasos na área da lesão;
e) Quantificar a liberação de citocinas características do processo reparo tecidual;
f) Quantificar a deposição de colágeno.

5 **MATERIAL E MÉTODOS**

5.1 **Animais**

Todos os procedimentos realizados foram autorizados pelo Comitê de Ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA/009/2013) (Anexo A).

Camundongos Swiss machos com 8-10 semanas de idade foram mantidos em caixas plásticas (30×20×13 cm) (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) em uma sala com temperatura controlada, exaustão de ar (15 minutos/hora) e ciclo de claro e escuro de 12 horas cada, com livre acesso à comida e água filtrada.

5.2 **Modelo de exercício**

Os animais foram submetidos ao modelo de exercício previamente descrito (KOHUT *et al.*, 2004; ZOGAIB e MONTE-ALTO-COSTA, 2011). Para realização do modelo de exercício os animais foram exercitados em uma esteira motorizada para camundongos com baias individuais. O exercício físico de intensidade moderada foi escolhido de acordo com trabalho prévio do Laboratório de Reparo Tecidual (ZOGAIB e MONTE-ALTO-COSTA, 2011).

Antes do início do protocolo de exercício, os animais do grupo exercitado (n=16) foram aclimatados por uma semana na esteira (semana de treino), onde foram exercitados três vezes na semana (segunda, quarta e sexta feira), durante 5 minutos na velocidade de 5m/min. A partir da semana seguinte, o protocolo de exercício propriamente dito foi iniciado. Assim, os animais foram exercitados na esteira motorizada cinco vezes por semana (de segunda a sexta feira) e descansaram dois dias consecutivos (sábado e domingo). O protocolo de exercício foi mantido por 6 ou 8 semanas. A velocidade e o tempo aumentaram gradativamente até a velocidade final de 8 m/min e o tempo final de 45 minutos (Anexo B). Durante todo o protocolo de exercício, os primeiros 3 minutos e os últimos 3 minutos de corrida foram realiza-

dos na velocidade de 5m/min para aquecimento e recuperação dos animais respectivamente.

5.3 **Modelo de estresse crônico**

Outro grupo de animais (n=10) não realizou o protocolo de exercício físico, mas para submetê-los ao efeito da manipulação, vibração da esteira e privação de água e comida, este grupo foi alocado em uma caixa plástica sem água ou ração e colocado sobre a esteira durante o tempo de corrida do grupo exercitado.

No final da sexta semana de exercício, os animais exercitados e sedentários foram submetidos ao modelo de estresse rotacional (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2009). Para isso, a caixa dos animais foi posicionada sobre um agitador mecânico que rotacionava a caixa dos animais a 115 rpm durante 15 minutos a cada hora, durante 24 horas por dia, até a eutanásia.

5.4 **Modelo de lesão**

No dia da lesão, todos os animais foram anestesiados com quetamina (150 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) intraperitoneal. O dorso dos animais foi tricotomizado e duas lesões excisionais totais foram realizadas com auxílio de um *punch* de biópsia de 8mm de diâmetro. As lesões foram posicionadas a dois centímetros de distância do osso occipital na linha mediana e a um centímetro de distância entre elas. A epiderme e a derme foram completamente removidas expondo o tecido muscular subjacente. A lesão não foi suturada ou coberta por curativo e cicatrizou por segunda intenção.

5.5 **Desenho experimental**

Para compreender melhor os efeitos do exercício físico sob o estresse crônico no reparo tecidual foram idealizados dois grupos de exercício físico distintos:

- *Exercício físico concomitante ao estresse crônico*

Neste protocolo o exercício foi realizado como descrito anteriormente até a oitava semana. No final da sexta semana, os animais exercitados foram submetidos ao estresse rotacional descrito acima. Assim, seguiram-se duas semanas de exercício físico e estresse crônico concomitantes. No final da oitava semana, as lesões foram realizadas como descrito anteriormente, o exercício físico parou, e o estresse crônico foi mantido até o dia da eutanásia. As lesões foram medidas e fotografadas no dia de realização das mesmas (d0), e 3, 7 e 10 dias após (d3, d7 e d10). Dez dias após a lesão os animais sofreram a eutanásia (Figura 3);

- *Exercício físico prévio ao estresse crônico*

Neste protocolo o exercício foi realizado como descrito anteriormente até a sexta semana. No final da sexta semana, o exercício físico parou, os animais exercitados foram submetidos ao estresse rotacional descrito acima até a eutanásia. Assim, seguiram-se duas semanas de estresse crônico apenas. No final da oitava semana, as lesões foram realizadas como descrito anteriormente. As lesões foram medidas e fotografadas no dia de realização das mesmas (d0), e 3, 7 e 10 dias após (d3, d7 e d10). Dez dias após a lesão os animais sofreram a eutanásia (Figura 3).

Assim, para a realização deste trabalho foram estudados quatro grupos distintos:

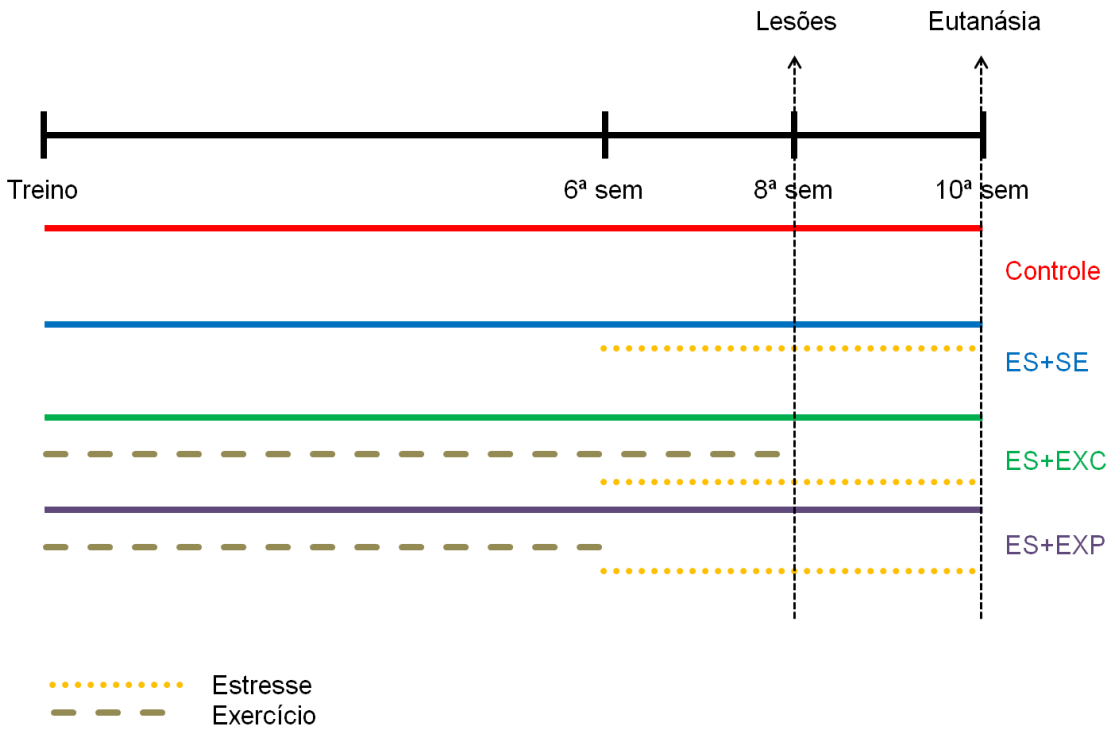
a) grupo controle (n=5) – este grupo não foi submetido ao protocolo de exercício físico moderado, nem ao protocolo de estresse crônico, mas foi submetido ao modelo de lesão;

b) grupo estressado+sedentário (n=10) – este grupo não foi submetido ao protocolo de exercício físico, mas foi submetido ao protocolo de estresse crônico e ao modelo de lesão;

c) grupo estressado+exercício concomitante (n=10) – este grupo foi submetido ao protocolo de exercício físico, estresse crônico e ao modelo de lesão, com duas semanas de prática concomitante de exercício físico e estresse;

d) grupo estressado+exercício prévio (n=6) - este grupo foi submetido ao protocolo de exercício físico, estresse crônico e ao modelo de lesão, entretanto o exercício físico foi realizado apenas previamente ao estresse.

Figura 3 – Desenho experimental



Legenda: Síntese dos eventos do desenho experimental, indicando cada grupo a quais modelos é submetido, ES+SE significa estressado+sedentário; ES+EXC, estressado+exercício concomitante; e ES+EXP, estressado+exercício prévio.
Fonte: A autora, 2016.

5.6 **Níveis sanguíneos de lactato**

Para confirmar a intensidade do exercício foi realizada a análise do lactato sanguíneo (FERREIRA *et al.*, 2007). Essa análise foi realizada nos animais do grupo ES+EXC. Para ser considerado um exercício físico de intensidade moderada, os níveis de lactato não deveriam variar ao longo do experimento. Os níveis de lactato foram dosados antes do protocolo de aclimatação (basal), após oito semanas de exercício, no dia da realização da lesão e no dia da eutanásia. Para isto, um pequeno corte foi realizado na extremidade distal da cauda dos camundongos, enquanto se exercitavam, e uma gota do sangue periférico foi aplicada sobre tiras de lactato (BM-Lactate; Roche, Diagnostics, Basiléia, Suíça) acopladas ao aparelho Accutrend Plus (Roche).

Assim, cada aspecto do protocolo de experimento foi isolado e foi possível analisar se o exercício, estresse e lesão possuíam influência sobre os níveis de lactato sanguíneo. O resultado foi expresso em mM de lactato sanguíneo.

5.7 **Análises macroscópicas**

O peso corporal foi avaliado desde o início do protocolo de exercício físico até o dia da eutanásia.

No dia da realização da lesão (dia 0) e 3, 7 e 10 dias após a área da lesão foi medida. Para isto, um papel celofane transparente foi colocado sobre o dorso do animal, e com uma caneta permanente preta o bordo da lesão foi desenhado (NASCIMENTO e COSTA, 2006). Em seguida, os desenhos foram digitalizados e medidos com o auxílio do software de imagens ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA). As lesões também foram fotografadas 3, 7 e 10 dias após a lesão (NASCIMENTO e COSTA, 2006).

Sete e dez dias após a realização da lesão as lesões foram analisadas também quanto à porcentagem de reepitelização. Isso foi feito a partir da diferença da medida da área total da lesão, e da área reepitelizada. O resultado foi expresso em porcentagem da área total reepitelizada (NASCIMENTO e COSTA, 2006).

5.8 **Sacrifício e coleta das amostras**

Dez dias após a realização da lesão, os animais foram novamente anestesiados como descrito anteriormente. Após a anestesia, esperou-se 20 minutos para que os níveis de catecolaminas se reestabelecessem e não houvesse interferência da manipulação na dosagem posterior. Após os 20 minutos, os animais foram decapitados e o sangue periférico foi coletado e centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos e o soro foi obtido.

Aleatoriamente, uma das lesões com pele sã adjacente foi coletada e fixada em paraformoldeído tamponado (pH 7,2) para análises microscópicas. A outra lesão foi congelada em nitrogênio líquido e depois estocada a -70°C para análises bioquímicas.

As lesões fixadas em formaldeído foram clivadas, desidratadas em séries crescentes de álcool etílico, clarificadas em xileno, infiltradas e incluídas em parafina.

5.9 **Níveis plasmáticos de normetanefrina**

A normetanefrina é o principal metabólito estável da epinefrina. Assim, os níveis de normetanefrina podem ser utilizados para confirmar as alterações fisiológicas do estresse psicológico (PISANO, 1960). Para isto, o plasma foi diluído em hidróxido de amônio a 4N (diluição 1:40). Em seguida adicionou-se metaperiodato de sódio a 2% e a amostra foi homogeneizada. A mistura foi lida em espectrofotômetro a 350 nm. Quantidades conhecidas (0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0 e 4,0 ng/µL) de DL-normetanefrina (Sigma-Aldrich, St. Louis, CA) também foram preparadas e lidas em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em ng de normetanefrina por µl de plasma.

5.10 **Análises histológicas**

A partir do material incluso em parafina, cortes histológicos (5 μm) foram obtidos em lâminas histológicas. Para a análise geral do tecido, as lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). Para isso, as lâminas foram desparafinizadas com xilol e em seguida hidratadas com concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 90% e 70%) e em seguida água destilada. Após a imersão das lâminas nos corantes (hematoxilina e eosina respectivamente), os cortes foram novamente desidratados através da imersão em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 90% e 100%) e clarificadas com xilol. Por fim, as lâminas foram montadas utilizando-se entelan e uma lamínula de vidro. Os cortes também foram corados com vermelho de picrossírius de maneira semelhante à descrita para a coloração de HE, diferindo-se o corante utilizado, que foi o vermelho de picrossírius. Quando prontas, as lâminas foram observadas sob luz polarizada para avaliação da distribuição e organização das fibras do sistema colágeno. O vermelho de picrossírius é um corante aniônico forte que reage com o colágeno através da reação do ácido sulfônico presente na sua composição, com os grupos básicos presentes na molécula de colágeno. A molécula alongada de corante se liga paralelamente à fibra de colágeno aumentando a birrefringência (JUNQUEIRA *et al.*, 1979).

5.11 **Espessura da neoepiderme**

A espessura da neo-epiderme foi avaliada em cortes histológicos corados com HE, usando um sistema de videomicroscopia com objetiva de 40X (Microscópio Zeiss Axiostar plus, câmera Axiocam Cc1, monitor Samsung) e o software de imagens Axiovision SE64 RE. 4.8 (Carl Zeiss-Vision, Jena, Alemanha). A espessura da neo-epiderme foi determinada como a distância em micrômetros da camada basal até a camada granulosa. Foram realizadas três medidas por campo e três a cinco campos por animal. Os resultados foram expressos em micrômetros (μm).

5.12 **Imunohistoquímica**

A quantificação de vasos e miofibroblastos positivos para α-actina de músculo liso (α-SMA) foi realizada utilizando a técnica de imunohistoquímica com um anticorpo monoclonal produzido em camundongo. Assim, algumas modificações na técnica padrão foram realizadas (CARDOSO *et al.*, 2007). Os cortes foram incubados com sistema Envision anti-camundongo (DAKO; Carpinteria, CA;1:60) para neutralizar as IgGs de camungongo inespecíficas presentes no tecido. Posteriormente os cortes histológicos foram incubados com peróxido de hidrogênio 3% diluído em metanol por 45 minutos. Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados com uma mistura de anticorpo primário anti-α-actina de músculo liso (DAKO; 1:600) e Sistema Envision (DAKO; 1:20) por 2 horas. A diaminobenzidina foi utilizada como cromógeno e os núcleos das células foram corados com hematoxilina para auxiliar na quantificação do material.

A distribuição de miofibroblastos e de vasos capilares com pericitos positivos para α-actina de músculo liso foi estimada utilizando um sistema com 16 pontos. O número de pontos que tocaram as estruturas positivas foi contado utilizando um sistema de videomicroscopia (TNB41 OPTON microscope, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany; TecVoz CCD Sony video camera, Sony Corporation, Manaus, Brasil; CCE monitor, Sony Corporation, Manaus, Brasil). Os campos aleatórios (cerca de 5 campos por animal) no tecido de granulação foram analisados na região superficial utilizando a objetiva de 40x. Os dados foram expressos em densidade de volume de miofibroblastos ($Vv_{[miofibroblastos]}$%) ou de vasos sanguíneos ($Vv_{[vasos]}$%).

Para quantificar macrófagos e neutrófilos, o mesmo processo de desparafinização e hidratação descritos anteriormente foram utilizados. Os sítios antigênicos dos cortes histológicos das lesões foram recuperados com aquecimento (70°C) dos cortes em tampão citrato (pH 6,0). Após os cortes resfriarem lentamente sobre a bancada, a peroxidase endógena foi inibida incubando os cortes com peróxido de hidrogênio a 3% diluído em metanol. Em seguida, foram adicionados os anticorpos primários, feitos em rato, anti-F4/80 (Serotec Inc., Raleigh, CN; 1:500) para detecção dos macrófagos e anti-mieloperoxidase (MPO) (Santa Cruz Inc., Paso Robles, CA; 1:500) para detecção dos neutrófilos. Os anticorpos primários foram detectados utilizando anticorpos secundários anti-rato (DAKO; 1:800). A diaminobenzidina foi usada

como cromógeno, e os núcleos das células foram corados com hematoxilina para auxiliar na quantificação do material.

Para quantificação de células positivas para F4/80 e MPO, campos aleatórios ao longo do tecido de granulação (cerca de 5 campos por animal) foram analisados utilizando a objetiva de 40X. Para isso, um sistema de videomicroscopia (microscópio OPTON, câmera TEC V02, e monitor CCE 14'') foi utilizado. Os resultados foram expressos em células positivas por mm^2.

5.13 **Níveis de hidroxiprolina**

A deposição de colágeno foi avaliada através da detecção dos níveis de hidroxiprolina nas lesões congeladas. Os níveis de hidroxiprolina das amostras foram medidos como descrito anteriormente (WOESSNER, 1961; ROMANA-SOUZA *et al.*, 2010). Fragmentos das lesões foram imersos em acetona PA por 24 horas, trocada duas vezes. Em seguida foram imersas em clorofórmio, também por 24 horas, trocada duas vezes. Então foram secas em estufa a 60°C por 1 hora. Os fragmentos de amostra foram pesados e então hidrolisadas em ácido clorídrico 6 N por 18 horas a 110º C. Em seguida, as amostras foram diluídas com água destilada e neutralizadas com hidróxido de sódio 6 N, e centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos. As amostras foram diluídas e pipetadas em uma placa de 96 poços. Adicionou-se cloramina T 0,05M em todos os poços que reagiram por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado ácido perclórico 3,15M por 5 minutos. A seguir adicionou-se 4-DABaldeído 20% e a placa foi incubada por 20 minutos a 60°C. A placa esfriou sobre a bancada e foi lida em espectrofotômetro a 550nm. Quantidades conhecidas (0; 1; 2; 3; 5; 7 e 10 ng/mL) de l-hidroxiprolina (Sigma Aldrich) também foram preparadas e lidas em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nanograma de hidroxiprolina por miligrama de lesão.

5.14 **Imunoblotting**

Fragmentos das lesões congelados foram macerados em tampão de lise (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 138 mM NaCl, 10% glicerol, 1% Triton X-100, coquetel inibidor de protease P2714 (Sigma-Aldrich, St Louis,MO). A concentração de proteínas totais foi determinada como determinada através do ensaio proteico de ácido bicincônico (BCA (Thermo Fisher Scientific, Rockwood, TN). Quantidades iguais de proteína (30 µg) foram separadas de acordo com o peso molecular através da eletroforese em géis de SDS-poliacrilamida a 8 ou 10%. As proteínas foram transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) ou nitrocelulose. Padrões de peso molecular foram inclusos (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA). As membranas foram incubadas com 5% de leite em pó desnatado (Nestlé, São Paulo, Brasil) dissolvido em PBS contendo 0,05% de Tween-20 para bloquear as ligações inespecíficas dos anticorpos na membrana. A seguir, as membranas foram incubadas overnight a 4ºC com os anticorpos primários feito em coelho anti colágeno do tipo I (pré-colageno tipo I 140-210 kda; colágeno tipo I maduro 70-90 kda) (Millipore,Temecula,CA, 1:500), camundongo anti colágeno III (138 kda) (Millipore, 1:600), feito em camundongo anti elastina (50-85 kda) (Santa Cruz Biotechnology, 1:200) ou feito em camundongo anti fator de crescimento endotelial vascular-A (VEGF-A) (45 kDa) (Santa Cruz Biotechnology; 1 : 500). Em sequência as membranas foram lavadas e incubadas com os anticorpos secundários anti-coelho para colágeno tipo I (Santa Cruz Biotechnology, 1:800) ou anti-camundongo para as outras proteínas (DAKO,1:200). Os complexos epítopo-anticorpos foram detectados através da quimioluminescência aumentada (ECL) (Santa Cruz Biotechnology). Para detecção da quimioluminescência, o sistema de capturas ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) e o software Image Lab 4.1 (Bio-Rad Laboratories) foram utilizados. Em seguida, as membranas foram estripadas (Tris HCl, SDS 2%, β-mercaptoetanol) e reincubadas overnight com anticorpo monoclonal de camundongo contra β-actina (1:1000; Sigma-Aldrich). Após lavagens as membranas foram incubadas com sistema Envision anti-camundongo (1:200; DAKO). As bandas foram analisadas por densitometria utilizando o software de imagens ImageJ (National Institutes of Health) e os resultados foram expressos em unidade arbitrária (u.a).

5.15 **Técnica de ELISA**

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) foi realizado para a detecção TNF-α e de TGF-β1 nos homogenizados teciduais. Para isso, a lesão foi macerada em tampão de lise como descrito anteriormente e congelada em freezer -70ºC até o dia do ensaio. A detecção foi realizada utilizando o kit de ELISA (BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. Assim, as placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura diluído em tampão de revestimento, selada e incubada overnight a 4ºC. Em seguida, a placa foi lavada com tampão de lavagem e bloqueada com diluente de ensaio. Posteriormente, concentrações conhecidas de padrão ou amostra foram colocadas na placa, que foi selada novamente e incubou por duas horas em temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente e incubada com detector de trabalho (anticorpo de detecção+ sistema estreptavidina-HRP) por uma hora em temperatura ambiente. A microplaca foi incubada com a solução de substrato por 30 minutos, em temperatura ambiente e protegida da luz. A seguir, foi aplicada a solução de parada, e a placa foi lida em 450nm e 570nm. A diferença entre as duas absorbâncias obtidas foi realizada. Os resultados foram expressos em pg de TNF-α ou TGF-β1 por mg de proteína total.

5.16 **Análises estatísticas**

Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. Os dados foram analisados através do teste t de Student com correção de Welch (lactato), do teste Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn para dados não paramétricos (hidroxiprolina), ou ANOVA com pós teste de Bonferroni para dados paramétricos (contração, reepitelização, normetanefrina, neutrófilos, macrófagos, TNF-α, miofibroblastos, TGF-β, razão de colágeno I por colágeno III, vasos sanguíneos, VEGF-A e espessura da neo-epiderme) utilizando o software GraphPad Prism (GraphPadPrism version 6.0, SanDiego, CA). Apenas valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos e estão representados nos gráficos por # vs. controle, * vs. ES+SE, ou & vs. ES+EXC.

6 **RESULTADOS**

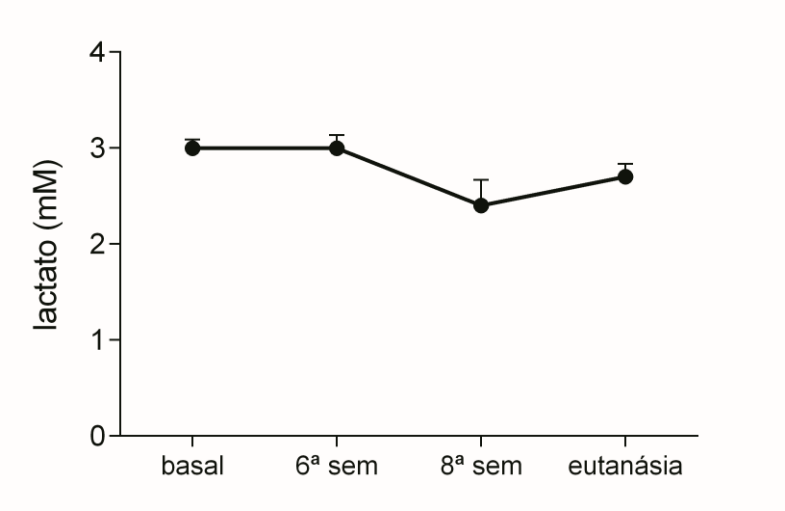
6.1 **Indução de exercício moderado**

Para confirmar que o modelo de exercício adotado era moderado, foram avaliados os níveis sanguíneos de lactato. Não houve diferença estatística nos níveis de lactato em nenhum dos momentos avaliados, confirmando o protocolo de exercício moderado (Figura 4).

6.2 **Indução de estresse**

A normetanefrina é a substancia mais estável resultante do metabolismo da epinefrina. Por este motivo, pode ser usada para avaliar a ativação do sistema nervoso simpático que estimula a medula adrenal a secretar catecolaminas. O estresse rotacional aumentou a expressão de normetanefrina plasmática nos grupos ES+SE, ES+EXC e ES+EXP quando comparados ao grupo controle (Figura 5). O exercício físico moderado praticado em concomitância com o estresse (ES+EXC) potencializou a secreção de epinefrina quando comparado ao grupo ES+SE (Figura 5). Adicionalmente, a performance prévia de exercício ao estresse (ES+EXP) diminuiu os níveis plasmáticos de normetanefrina quando comparado ao grupo ST+EXC (Figura 5).

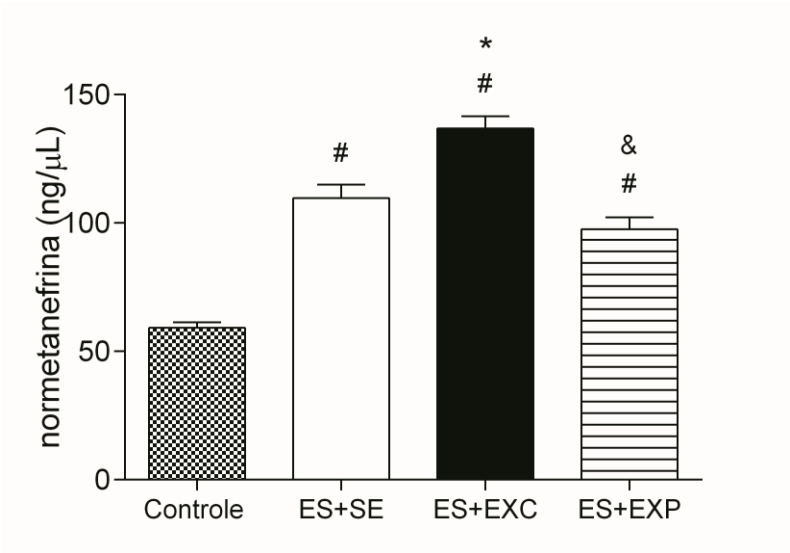
Figura 4 – Níveis de lactato sanguíneo durante o modelo experimental



Legenda: Esta análise foi feita somente nos animais do grupo estresse + exercício concomitante (ES+EXC). Os níveis de lactato foram avaliados em quatro momentos: basal (antes dos animais serem treinados); na 6ª semana (antes dos animais serem submetidos ao estresse); na 8ª semana (antes dos animais serem submetidos à lesão) e no dia da eutanásia. Média ± EPM (n=10).

Fonte: A autora, 2016.

Figura 5 – Efeito do exercício e estresse nos níveis de normetanefrina



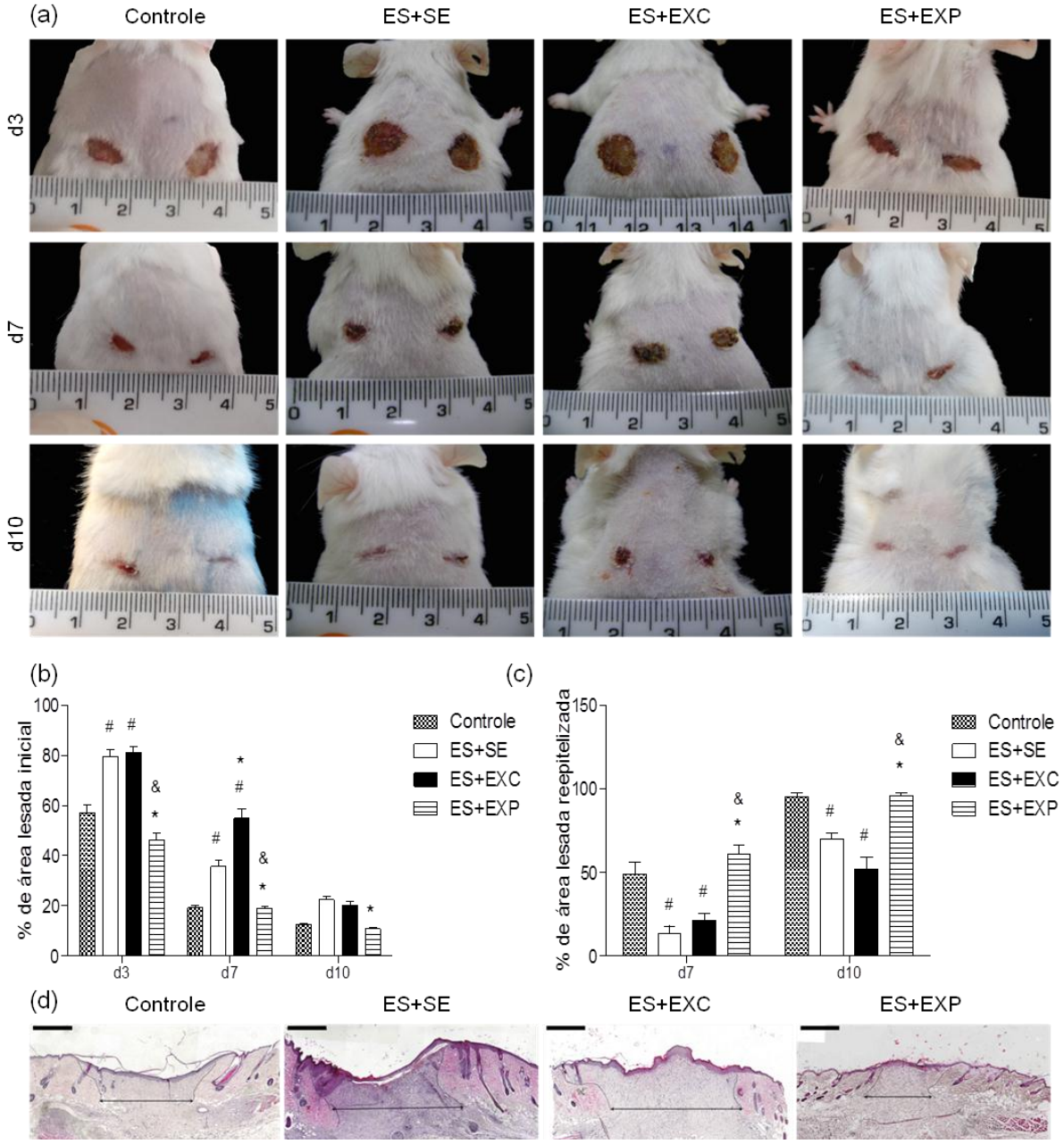
Legenda: Níveis plasmáticos de normetanefrina dos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE); estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) 10 dias após a lesão. Média ± EPM (controle n=5; ES+SE e ES+EXC n=10; ES+EXP n=6). $p<0,05$ # vs. grupo controle, * vs. grupo ES+SE, & vs. grupo ES+EXC.

Fonte: A autora, 2016.

6.3 **Macroscopia, contração e reepitelização**

Ao observar a macroscopia, a área lesada dos animais parece maior nos grupos ES+SE e ES+EXC nos dias 3 e 7 após a lesão quando comparadas ao controle (Figura 6 a). Aparentemente a performance prévia do exercício (ES+EXP) inibiu o retardo no fechamento da lesão induzido pelo estresse quando comparado aos grupos ES+SE e ES+EXC (Figura 6 a). Para confirmar este efeito, a área da lesão foi medida (Figura 6 b). A área da lesão estava maior nos grupos ES+SE e ES+EXC 3 e 7 dias após a lesão quando comparada ao grupo controle (Figura 6 b). A performance simultânea de exercício e estresse (ES+EXC b) potencializou o atraso na contração da lesão 7 dias após a lesão comparado ao grupo ES+SE (Figura 6 b). Adicionalmente, a prática do exercício físico previa ao estresse (ES+EXP) reverteu o atraso na contração da lesão induzido pelo estresse, nos dias 3, 7 e 10 após a lesão, comparadas ao grupo ES+SE (Figura 6 b). A área reepitelizada dos grupos ES+SE e ES+EXC estava menor que no grupo controle 7 e 10 dias após a lesão (Figura 6 c). A performance prévia do exercício (ES+EXP) reverteu o atraso na reepitelização tanto 7 quanto 10 dias após a lesão, quando comparado aos grupos ES+SE e ES+EXC (Figura 6 c). Microscopicamente o mesmo padrão foi mantido: a área de tecido de granulação do grupo ES+SE é maior que no controle, o grupo ES+EXC potencializa este efeito, apresentando área de tecido de granulação ainda maior, e o grupo ES+EXP reverte, apresentando tamanho de área de tecido de granulação semelhante ao controle (Figura 6 d).

Figura 6 – Efeito do exercício concomitante ou prévio e do estresse na contração e reepitelização de lesões



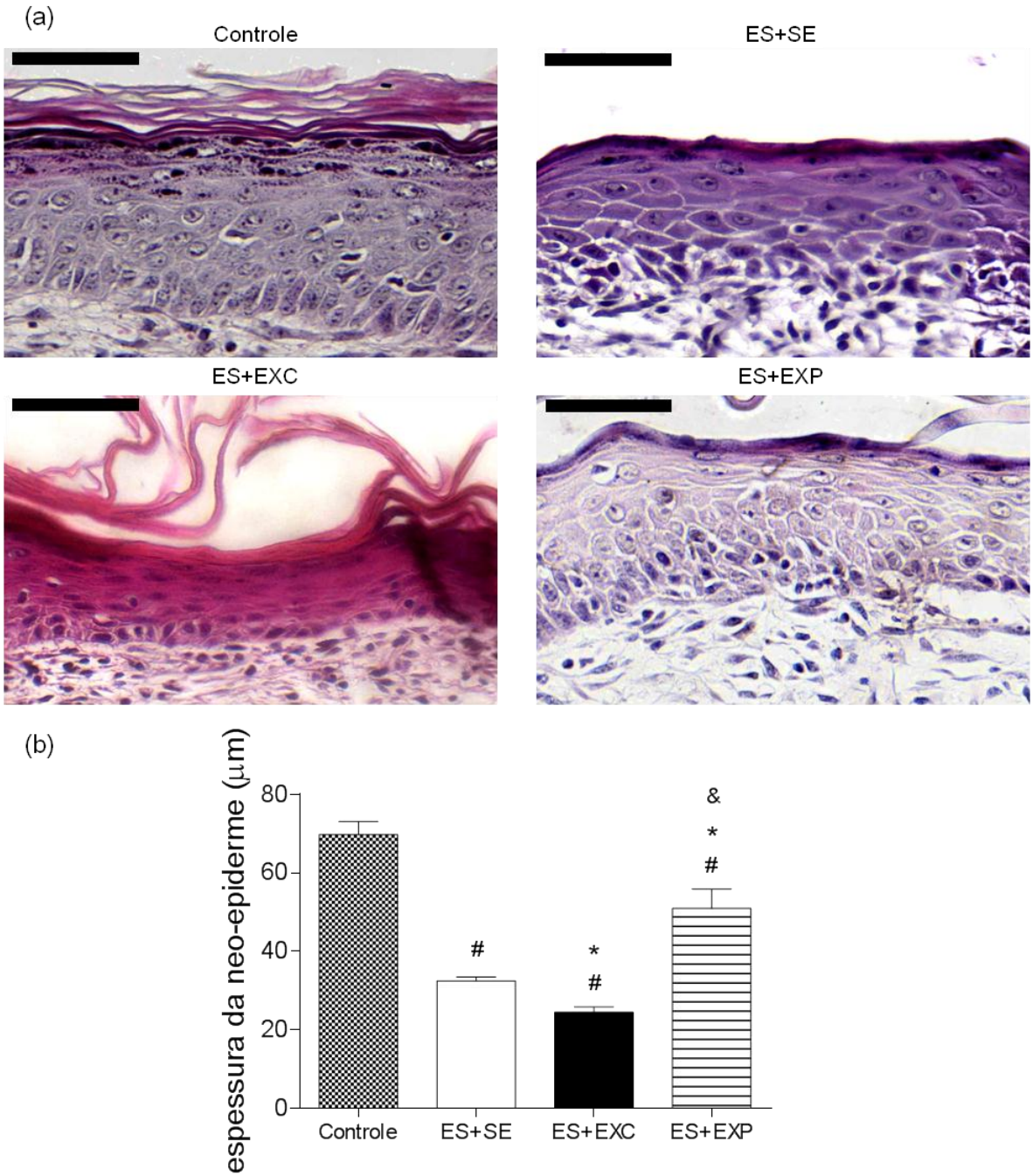
Legenda: (a): Fotografias representativas das lesões dos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) nos dias 3 (d3), 7 (d7) e 10 (d10) após a lesão. (b): Medida de contração da lesão nos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) nos dias 3 (d3), 7 (d7) e 10 (d10) após a lesão. (c): Porcentagem de área reepitelizada nos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) nos dias 7 (d7) e 10 (d10) após a lesão. (d): Fotomicrografias representativas de cortes da área de lesão corados com hematoxilina e eosina dos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) 10 dias após a lesão. Barra = 500 µm. A seta preta indica o comprimento da lesão. Média ± EPM (controle n=5; ES+SE e ES+EXC n=10; ES+EXP n=6). $p<0,05$ # vs. grupo controle, * vs. grupo ES+SE, & vs. grupo ES+EXC.

Fonte: A autora, 2016.

6.4 **Aspecto geral do tecido e espessura de neoepiderme**

O estresse (ES+SE e ES+EXC) diminui a espessura da neoepiderme quando comparado ao grupo controle (Figura 7 a-b). A prática concomitante do exercício físico moderado (ES+EXC) potencializou este efeito quando comparado ao grupo ES+SE (Figura 7 a-b). A prática prévia do exercício físico ao estresse atenuou este efeito, uma vez que o grupo ES+EXP apresentou a neoepiderme mais espessa que os grupos ES+SE e ES+EXC, embora mais fina que a do grupo controle (Figura 7 a-b).

Figura 7 – Efeito do exercício e estresse na espessura da neoepiderme



Legenda: (a): Fotomicrografias representativas de cortes da área da lesão corados com hematoxilina & eosina nos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) 10 dias após a lesão. Barra = 50 µm. (b): Medida da espessura da neoepiderme dos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) 10 dias após a lesão. Média ± EPM (controle n=5; ES+SE e ES+EXC n=10; ES+EXP n=6). $p<0,05$ # vs. grupo controle, * vs. grupo ES+SE, & vs. grupo ES+EXC.

Fonte: A autora, 2016.

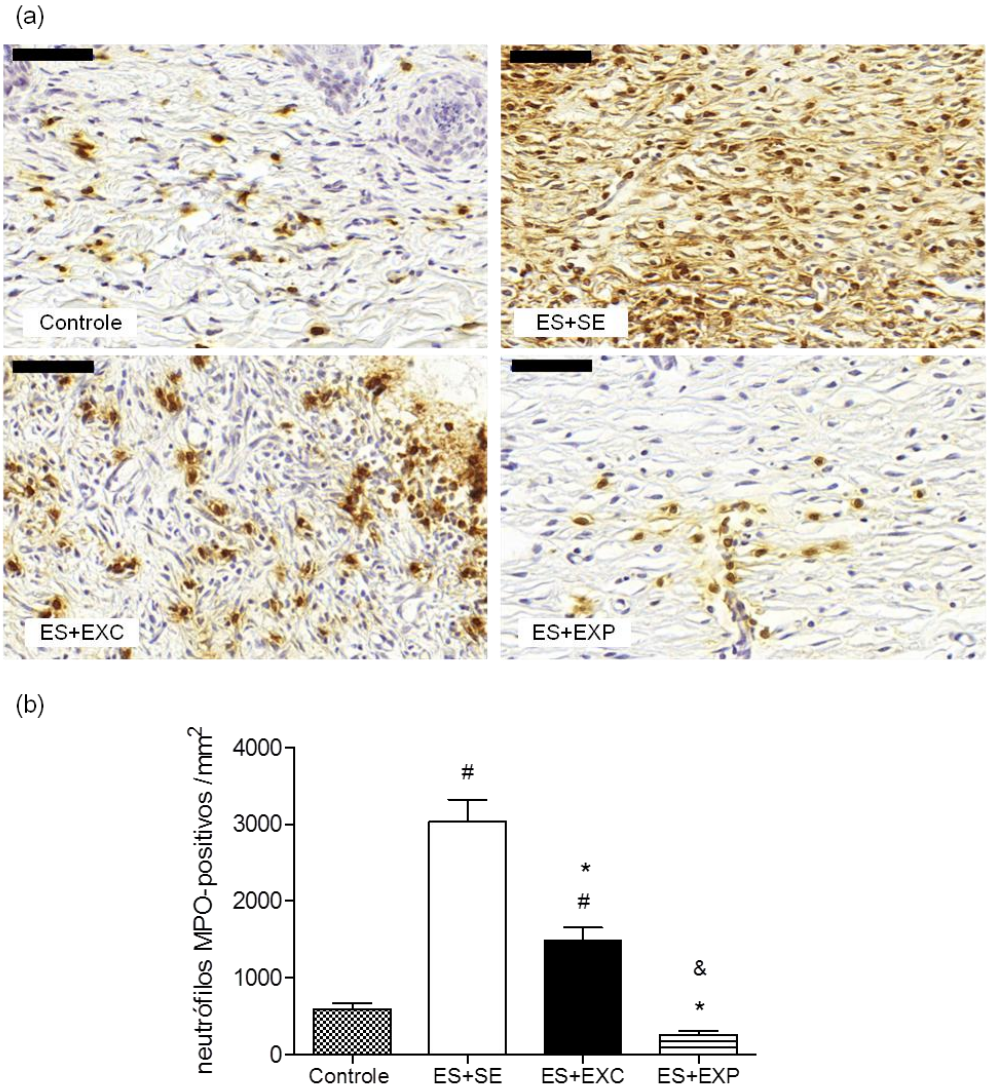
6.5 **Infiltração de neutrófilos**

Observou-se o aumento do número de neutrófilos no tecido de granulação 10 dias após a lesão no grupo ES+SE comparado ao grupo controle (Figura 8 a-b). O grupo ES+EXC apresentou mais neutrófilos que no grupo controle e menos que no grupo ES+SE (Figura 8 a-b). O grupo ES+EXP apresentou menor número de neutrófilos no tecido de granulação comparado aos grupos ES+SE e ao ES+EXC e não teve diferença do grupo controle (Figura 8 a-b).

6.6 **Infiltração de macrófagos e inflamação**

Observou-se um maior número de macrófagos no tecido de granulação do grupo ES+SE 10 dias após a lesão quando comparado ao grupo controle (Figura 9 a-b). Tanto o grupo com prática de exercício concomitante quanto prévia ao estresse apresentaram menor número de macrófagos infiltrados no sítio da lesão quando comparado ao grupo controle e ao grupo ES+SE (Figura 9 a-b). Houve menor expressão proteica de TNF-α no grupo ES+SE comparado ao grupo controle (Figura 9 c). No grupo ES+EXC diminuiu ainda mais a expressão de TNF-α (Figura 9 c). No grupo ES+EXP houve menor expressão de TNF-α que nos grupos controle e ES+SE, e maior expressão que no grupo ES+EXC (Figura 9 c).

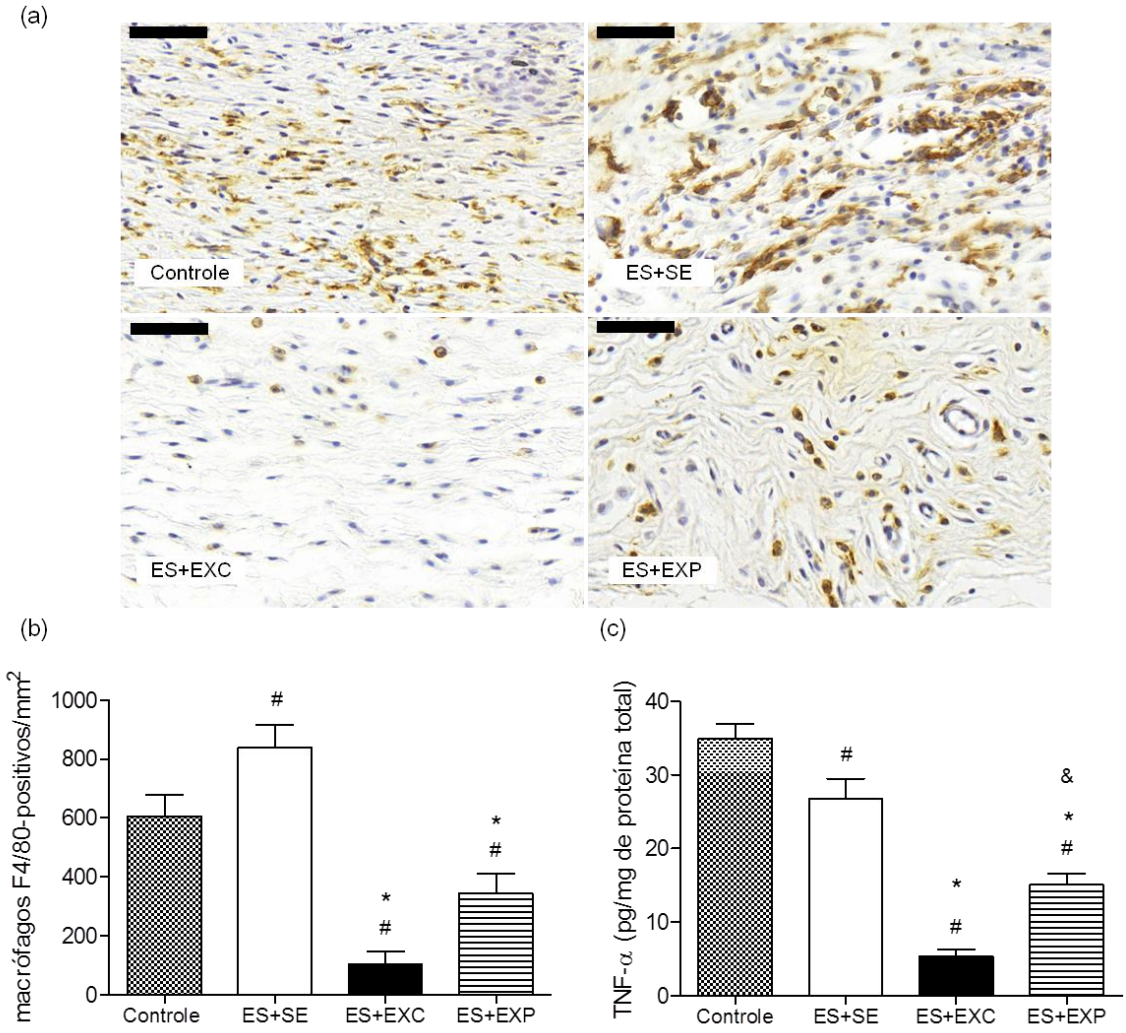
Figura 8 – Efeito do exercício e estresse na infiltração de neutrófilos



Legenda: (a): Fotomicrografias representativas de imunohistoquímica contra mieloperoxidase (MPO) na área da lesão dos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) 10 dias após a lesão. Barra = 50 µm. (b): Quantificação dos neutrópilos MPO positivos na área da lesão dos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) 10 dias após a lesão. Média ± EPM (controle n=5; ES+SE e ES+EXC n=10; ES+EXP n=6). $p<0,05$ # vs. grupo controle, * vs. grupo ES+SE, & vs. grupo ES+EXC.

Fonte: A autora, 2016.

Figura 9 – Efeito do exercício e estresse na infiltração de macrófagos e expressão de TNF-α na lesão



Legenda: (a): Fotomicrografias representativas de imunohistoquímica contra F4/80 na área da lesão dos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) 10 dias após a lesão. Barra = 50 µm. (b): Quantificação dos macrófagos F4/80 positivos na área da lesão dos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) 10 dias após a lesão. (c): Expressão proteica de fator de necrose tumoral-α (TNF-α) dos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) através de ELISA 10 dias após a lesão. Média ± EPM (controle n=5; ES+SE e ES+EXC n=10; ES+EXP n=6). $p<0,05$ # vs. grupo controle, * vs. grupo ES+SE, & vs. grupo ES+EXC.

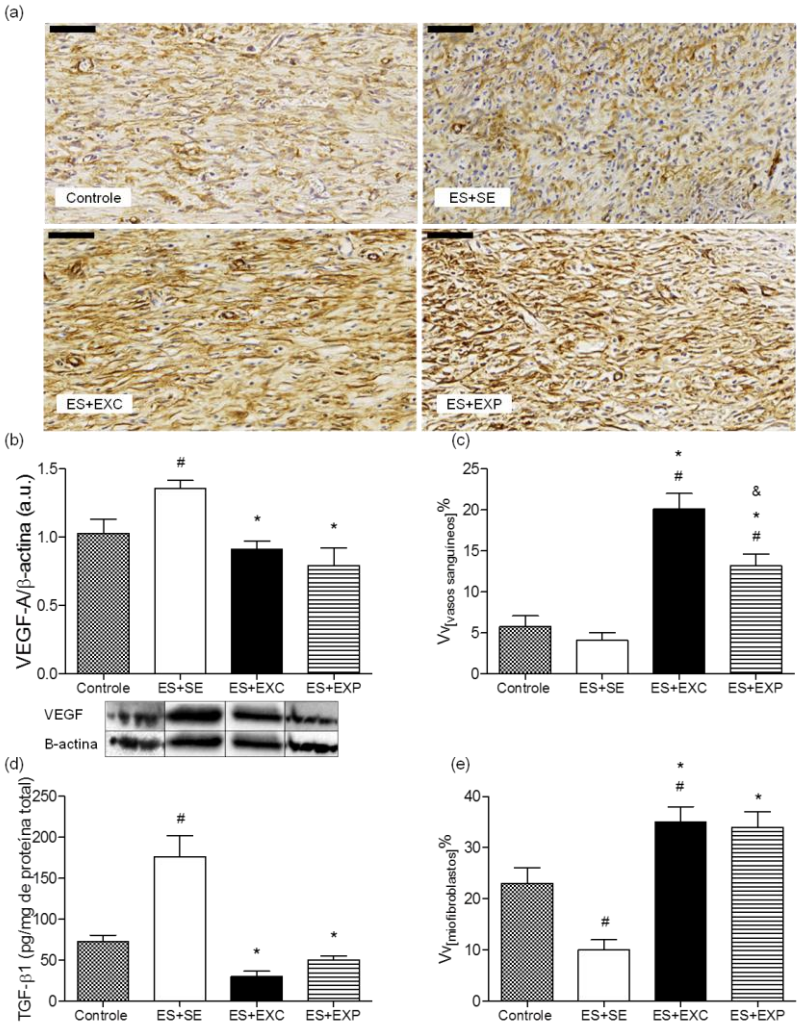
Fonte: A autora, 2016.

6.7 **Diferenciação miofibroblástica e angiogênese**

O grupo ES+SE apresentou maior expressão proteica de VEGF que o grupo controle, porém não apresentou diferença na densidade de volume vascular no tecido de granulação 10 dias após a lesão (Figura 10 a-c). Tanto o grupo ES+EXC e o grupo ES+EXP diminuíram a expressão de VEGF quando comparado ao grupo ES+SE e não apresentaram diferença quando comparado ao grupo controle (Figura 10 b). Ambos os grupos ES+EXC e ES+EXP apresentaram maior densidade de volume de vasos quando comparado aos grupos controle e ES+SE (Figura 10 a e c). Porém o grupo ES+EXP apresentou menor densidade de volume de vasos quando comparado ao grupo ES+EXC (Figura 10 a e c).

O grupo ES+SE apresentou maiores níveis de TGF-β1 que o grupo controle no lisado tecidual 10 dias após a lesão (Figura 10 d). Tanto os grupos ES+EXC e ES+EXP diminuíram os níveis de TGF-β1no lisado tecidual quando comparado ao grupo ES+SE, mas não apresentaram diferença quando comparado ao grupo controle (Figura 10 d). O grupo ES+SE apresentou menor densidade de volume de miofibroblastos que o grupo controle no tecido de granulação 10 dias após a lesão (Figura 10 a e e). O grupo ES+EXC apresentou maior densidade de volume de miofibroblastos que os grupos controle e ES+SE (Figura 10 a e e). O grupo ES+EXP apresentou maior densidade de volume de miofibroblastos que o grupo ES+SE, mas não houve diferença quando comparado ao grupo controle (Figura 10 a e e).

Figura 10 – Efeito do exercício e estresse na diferenciação miofibroblástica e angiogenese



Legenda: (a): Fotomicrografias representativas de imunohistoquímica contra α-actina de músculo liso (α-SMA) na área da lesão dos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) 10 dias após a lesão. Barra = 50 µm. (b) Níveis proteicos de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no lisado tecidual e imagens representativas das bandas de wenstern-blotting dos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) 10 dias após a lesão; as linhas pretas verticais indicam a junção de bandas não adjacentes do mesmo blot. (c): Densidade de volume (Vv) de vasos sanguíneos com pericitos α-SMA positivos na área da lesão dos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) 10 dias após a lesão. (d): Níveis proteicos de fator de crescimento transformante-β1 (TGF-β1) ativo no lisado da lesão dos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) através de ELISA 10 dias após a lesão. (e) Densidade de volume (Vv) de miofibroblastos α-SMA positivos na área da lesão dos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) 10 dias após a lesão. Média ± EPM (controle n=5; ES+SE e ES+EXC n=10; ES+EXP n=6). $p<0,05$ # vs. grupo controle, * vs. grupo ES+SE, & vs. grupo ES+EXC.

Fonte: A autora, 2016.

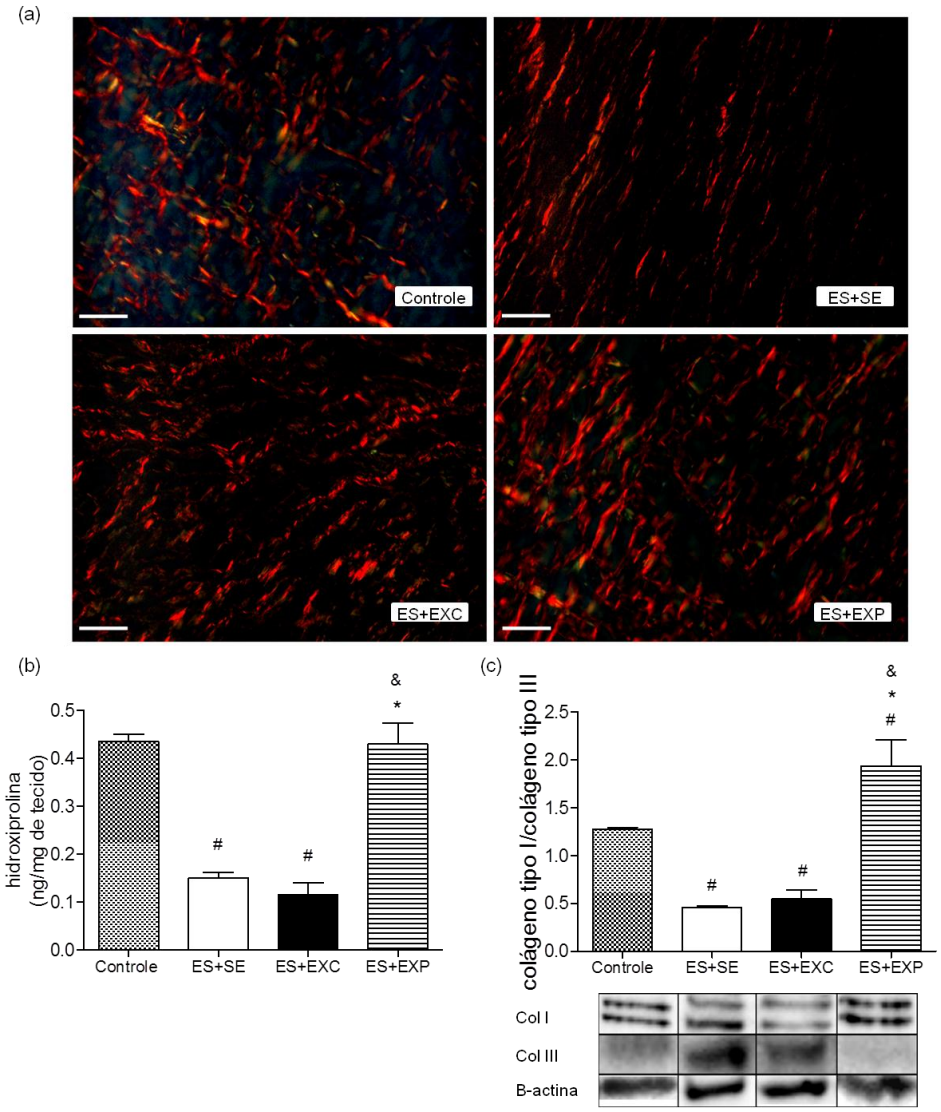
6.8 **Deposição de matriz extracelular**

O grupo controle apresentou fibras colágenas abundantes, espessas, longas e vermelhas brilhantes, organizadas com arranjo “basket-like” 10 dias após a lesão (Figura 11 a). Os grupos ES+SE e ES+EXC apresentaram fibras colágenas menos abundantes que no grupo controle, porém espessas, longas e vermelhas brilhantes, posicionadas paralelamente à margem da lesão no tecido de granulação 10 dias após a lesão (Figura 11 a). O grupo ES+EXP apresentou a organização das fibras colágenas similares à do grupo controle: fibras abundantes, espessas, longas e vermelhas brilhantes, em formato de cesto no tecido de granulação 10 dias após a lesão (Figura 11 a).

Os níveis de hidroxiprolina estavam diminuídos nos grupos ES+SE e ES+EXC comparados ao grupo controle no lisado tecidual 10 dias após a lesão (Figura 11 b). O grupo ES+EXP apresentou maior expressão de hidroxiprolina que os grupos ES+SE e ES+EXC, porém sem diferença com o grupo controle (Figura 11 b).

A razão de colágeno do tipo I pelo colágeno do tipo III estava menor nos grupos ES+SE e ES+EXC que no grupo controle no lisado tecidual 10 dias após a lesão (Figura 11 c). O grupo ES+EXP apresentou maior razão de colágeno I por colágeno III que os grupos controle, ES+SE e ES+EXC (Figura 11 c).

Figura 11 – Efeito do exercício e estresse na deposição de matriz extracelular



Legenda: (a): Fotomicrografias representativas de cortes corados com vermelho de picrossírius sobre luz polarizada dos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) 10 dias após a lesão mostrando a organização das fibras colágenas. Barra = 50 µm. (b): Níveis de hidroxiprolina no lisado da lesão dos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) 10 dias após a lesão. (c): Razão de colágeno tipo I por colágeno tipo III dos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) 10 dias após a lesão e imagens representativas das bandas de colágeno I, colágeno III e β-actina dos grupos controle, estressado+sedentário (ES+SE), estressado+exercício concomitante (ES+EXC) e estressado+exercício prévio (ES+EXP) 10 dias após a lesão; as linhas pretas verticais indicam a junção de bandas não adjacentes do mesmo blot. Média ± EPM (controle n=5; ES+SE e ES+EXC n=10; ES+EXP n=6). $p<0,05$ # vs. grupo controle, * vs. grupo ES+SE, & vs. grupo ES+EXC.

Fonte: A autora, 2016.

7 **DISCUSSÃO**

Estudos prévios demonstraram que, em pacientes e roedores cronicamente estressados, a fase inflamatória do reparo de lesões cutâneas tem seu início atrasado, porém é excessiva e prolongada (MARUCHA *et al.*, 1998; ROMANA-SOUZA *et al.*, 2010; ROMANA-SOUZA *et al.*, 2011; DE ALMEIDA *et al.*, 2013; ROSA *et al.*, 2014; BANDEIRA *et al.*, 2015). Por conta disso, estudos recentes vêm propondo novas estratégias para atenuar e combater os efeitos deletérios do estresse no reparo tecidual cutâneo como o uso de bloqueadores β-adrenérgicos, a administração de óleos comestíveis ou erva mate (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2009; BANDEIRA *et al.*, 2015; ROMANA-SOUZA, PIRES*, et al.*, 2015). O exercício físico é conhecido por promover um efeito anti-inflamatório (KOHUT *et al.*, 2006; KEYLOCK *et al.*, 2008), acelerando o reparo tecidual da pele (KEYLOCK *et al.*, 2008; ZOGAIB e MONTE-ALTO-COSTA, 2011; PENCE *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2016). Por conta disso, a hipótese do presente estudo foi que o exercício físico poderia atenuar os efeitos adversos do estresse no reparo tecidual.

Já se sabe que a corrida de intensidade moderada acelera o reparo de lesões cutâneas, assim como aumenta a deposição de colágeno no tecido de granulação de camundongos C57/BL6; entretanto, a corrida mais intensa não é tão benéfica para o reparo tecidual cutâneo 10 dias após a lesão (ZOGAIB e MONTE-ALTO-COSTA, 2011). Por conta disso, os animais foram treinados em esteira com intensidade moderada, usando o mesmo protocolo de exercício previamente descrito (ZOGAIB e MONTE-ALTO-COSTA, 2011). A intensidade do treino pode ser medida através dos níveis de lactato durante a performance do exercício físico (FERREIRA *et al.*, 2007). Os níveis de lactato foram medidos durante o experimento sem sofrer alteração, confirmando o modelo de exercício físico moderado.

O estresse aumenta os níveis plasmáticos de catecolaminas e glicocorticoides (CHARMANDARI *et al.*, 2005; WEBSTER MARKETON e GLASER, 2008; ROMANA-SOUZA *et al.*, 2009; ROSA *et al.*, 2014; BANDEIRA *et al.*, 2015; ROMANA-SOUZA, LIMA-CEZAR*, et al.*, 2015; ROMANA-SOUZA, PIRES*, et al.*, 2015), o que corrobora com o aumento dos níveis de normetanefrina plasmática obervado nos animais estressados. Por outro lado, um único estímulo de exercício através de ciclismo a 50% de VO_2 por 60 minutos pode aumentar os níveis plasmáticos de cortisol e catecola-

minas em pacientes (HODGSON *et al.*, 2013). Adicionalmente, pessoas que realizam treinamento de resistência a longo prazo apresentam maiores níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina durante o exercício físico quando comparados aos pacientes sedentários (JACOB *et al.*, 2004). Nossos resultados demonstram que em concomitância com o estresse, o exercício físico potencializou a liberação de catecolaminas, mas este efeito não foi observado quando o exercício foi praticado apenas previamente ao estresse. Sendo assim, a presença de dois estressores (psicológico e exercício) foram cumulativos no modelo estudado.

Sabe-se que o aumento excessivo dos níveis de catecolaminas induzido pelo estresse atrasa o reparo tecidual cutâneo (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2009; ROMANA-SOUZA *et al.*, 2011; ROSA *et al.*, 2014; BANDEIRA *et al.*, 2015). Desta forma, o grupo estressado sedentário apresentou contração e reepitelização atrasados quando comparado ao grupo controle. Também neste sentido, o aumento dos níveis plasmáticos de normetanefrina observado no grupo que praticou exercício simultâneo ao estresse pode ter contribuído para o atraso da contração e reepitelização da lesão. Sabe-se que o exercício físico melhora o reparo tecidual de camundongos idosos (KEYLOCK *et al.*, 2008), C57/BL6 (ZOGAIB e MONTE-ALTO-COSTA, 2011) e obesos induzidos por dieta high-fat (PENCE *et al.*, 2012). Porém, quando o exercício foi praticado apenas previamente ao estresse, os níveis de normetanefrina não aumentaram (comparado ao grupo estressado e sedentário) e a contração e reepitelização da lesão foram otimizadas quando comparado ao grupo estressado sedentário e estressado exercício concomitante. Estes resultados sugerem que a síntese excessiva de catecolaminas no exercício simultaneo ao estresse levam ao atraso no fechamento da lesão. Isto é corroborado pela otimização da contração e reepitelização da lesão observado no grupo que praticou o exercício apenas previamente ao estresse e não aumentou os níveis de normetanefrina comparado ao grupo estressado sedentário. Entretanto, não sabemos precisar porque o exercício prévio inibe os efeitos do estresse no reparo cutâneo, uma vez que também induz ao aumento da secreção de catecolaminas. Acreditamos que o exercício induza à ativação de vias diferentes além das ativadas pelo estresse. Quando praticado em concomitância ao estresse, o exercício potencializa a liberação de catecolaminas, e este aumento excessivo suprime o efeito benéfico do exercício. Quando a prática é prévia, o exercício exibe um efeito protetor ao estresse, apesar de também acionar a liberação de catecolaminas.

A reepitelização é um passo importante do reparo tecidual (BROUGHTON *et al.*, 2006). Os queratinócitos das margens migram através dos bordos da lesão e restauram a camada basal, e então proliferam para perfazer as camadas epidermais (BROUGHTON *et al.*, 2006). Já se sabe que o estresse atrasa a reepitelizaçao da lesão (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2009; ROMANA-SOUZA *et al.*, 2010; DE ALMEIDA *et al.*, 2013; ROSA *et al.*, 2014; BANDEIRA *et al.*, 2015). Por outro lado, o exercício moderado é conhecido por acelerar a reepitelização (ZOGAIB e MONTE-ALTO-COSTA, 2011). Em conformidade, o estresse diminuiu a espessura da neo-epiderme, a prática concomitante de exercício potencializou isto, enquanto a performance prévia de exercício atenuou este efeito 10 dias após a lesão. Isto indica que o estresse atrasou formação da neoepiderme, e os queratinócitos levaram mais tempo para recompor a camada basal e proliferar para poder reestabelecer as camadas epidérmicas. Isto reflete na epiderme mais fina. Adicionalmente, o exercício concomitante ao estresse potencializou a demora para reestabelecer as camadas epidérmicas através da mesma via, porém o exercício prévio atenuou este efeito, acelerando a reepitelização.

Os neutrófilos são as primeiras células a serem atraídas para o local da lesão e são cruciais para a limpeza dos debris celulares e micro-organismos (BROUGHTON *et al.*, 2006). Em seguida, mediadores específicos estimulam os monócitos a migrarem para o local da lesão e diferenciarem-se em macrófagos (BROUGHTON *et al.*, 2006). Os macrófagos liberam mediadores inflamatórios, como o TNF-α, que contribuem para o início da fase proliferativa (BROUGHTON *et al.*, 2006). Sabe-se que o aumento da secreção de catecolaminas mediado pelo estresse contribui para o atraso da infiltração de neutrófilos e macrófagos em lesões cutâneas (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2010; TYMEN *et al.*, 2013; ROSA *et al.*, 2014). Adicionalmente, altos níveis de catecolaminas retardam a expressão proteica de TNF-α até as fases finais do reparo tecidual (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2009; ROMANA-SOUZA *et al.*, 2010; DE ALMEIDA *et al.*, 2013). O estresse aumentou a infiltração de neutrófilos no tecido de granulação 10 dias após a lesão, o exercício concomitante ao estresse atenuou, enquanto o exercício prévio reverteu completamente este efeito. O estresse também aumentou a infiltração de macrófagos e ambos os grupos exercício concomitante ou prévio diminuíram os macrófagos no tecido de granulação 10 dias após a lesão. Todos os grupos estressados diminuíram a expressão de TNF-α no tecido de granulação 10 dias após a lesão. O aumento da liberação de cateco-

laminas mediado pelo estresse contribui para o atraso na infiltração de neutrófilos e macrófagos em lesões cutâneas (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2010; TYMEN *et al.*, 2013; ROSA *et al.*, 2014). Adicionalmente, o alto nível de catecolaminas atrasa a expressão proteica de TNF-α até as fases finais do reparo (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2009; ROMANA-SOUZA *et al.*, 2010; DE ALMEIDA *et al.*, 2013). Além disso, o exercício atenua a expressão proteica de TNF-α no hipocampo de ratos submetidos à privação do sono, apesar de também induzir o aumento de norepinefrina plasmática (CHENNAOUI *et al.*, 2015). Assim, o estresse aumentou os níveis de normetanefrina, que levaram a um influxo atrasado de neutrófilos e macrófagos para o local da lesão. O atraso na infiltração de células inflamatórias pode ter levado a liberação prejudicada de TNF-α e ao início da fase inflamatória, atrasando o desenvolvimento das fases subsequentes do reparo tecidual. O exercício físico em concomitância ao estresse, potencializou a secreção de epinefrina que em adição ao perfil anti-inflamatório do exercício pode ter induzido a uma fase inflamatória ainda mais prejudicada. Quando o exercício físico foi praticado previamente ao estresse, seus efeitos foram duradouros (KIM e HAN, 2016) e o processo de reparo tecidual foi semelhante ao grupo controle; não houve diferença na infiltração neutrofílica, e a quantidade de macrófagos e TNF-α tiveram uma pequena redução quando comparado ao controle, por conta das propriedades anti-inflamatórias do exercício físico (KOHUT *et al.*, 2006; KEYLOCK *et al.*, 2008).

Os macrófagos são responsáveis pela secreção de citocinas importantes para o reparo tecidual, uma vez que a sua infiltração na lesão está atrasada, todo o processo está comprometido. O estresse não alterou a densidade de vasos sanguíneos, mas aumentou a expressão de VEGF, 10 dias após a lesão, indicando que o estímulo para a angiogênese ainda está ocorrendo, uma vez que o VEGF é o maior estímulo para angiogênese e está aumentado na área de lesão de camundongos cronicamente estressados (ROSA *et al.*, 2014). Sabe-se que o exercício físico aumenta a densidade microvascular durante o reparo do miocárdio de rato (TANG *et al.*, 2011). Além disso, sabe-se que a corrida de baixa intensidade por 4 semanas aumenta o número de vasos sanguíneos na área da lesão 14 dias após a lesão quando comparado a animais sedentários (ZHOU *et al.*, 2016). Tanto o exercício concomitante quando o exercício prévio ao estresse promoveram angiogênese neste estudo, e uma vez que não era mais necessário, o VEGF reduziu naturalmente.

Macrófagos, queratinócitos e células endoteliais secretam TGF-β, que é o maior estímulo para atrair os fibroblastos e induzi-los a depositar matriz extracelular (SINGER e CLARK, 1999), além de estimular a diferenciação do fibroblasto a miofibroblasto (BROUGHTON *et al.*, 2006), que contrai aproximando os bordos da lesão (LI *et al.*, 2007) ajudando seu fechamento. O estresse aumentou a expressão de TGF-β1, mas diminuiu a densidade de volume de miofibroblastos, 10 dias após a lesão. Embora pareça conflitante, provavelmente isto é resultado do tempo de coleta de amostra, e que indica que o estímulo para a fibroplasia ainda está ocorrendo nos animais estressados. O exercício em concomitância ao estresse parece atenuar este efeito, uma vez que apresenta diminuição da expressão de TGF-β e o aumento da diferenciação miofibroblástica, indicando que o TGF-β já estimulou a diferenciação miofibroblástica, e a sua expressão é igual ao grupo controle. Além disso, a diminuição da expressão de TGF-β na prática concomitante de exercício e estresse pode ter ocorrido por conta da infiltração atrasada de macrófagos. Entretanto, a grande quantidade de miofibroblastos observada no grupo em que o exercício e estresse foram praticados em concomitância é surpreendente. A performance de exercício prévia ao estresse, inibiu o atraso da diferenciação miofibroblastica induzida pelo estresse, uma vez que apresentou os mesmos níveis de TGF-β e miofibroblastos que o controle. Altos níveis de epinefrina estimulam a liberação de TGF-β de fibroblastos de cultura primária (ROSA *et al.*, 2014). Além disso, já foi demonstrado que o estresse rotacional crônico aumenta a expressão de TGF-β no lisado da lesão nos dias 7 (BANDEIRA *et al.*, 2015) e 10 (ROMANA-SOUZA, PIRES*, et al.*, 2015) após a lesão, e diminui os níveis 14 dias após a lesão (DE ALMEIDA *et al.*, 2013) comparado a animais não estressados. Por outro lado o exercício prévio de corrida inibe a liberação de TGF-β em lesões glomerulares ou tubulointersticiais induzidas pela diabetes no rim de animais (AMARAL *et al.*, 2016). Além disso, a corrida de média intensidade realizada por 4 dias durante 60 minutos é capaz de diminuir os níveis plasmáticos de TGF-β quando comparado ao grupo sedentário (ORITA *et al.*, 2010). Adicionalmente, os miofibroblastos são as células responsáveis pela contração da lesão (BROUGHTON *et al.*, 2006), assim, o atraso na diferenciação miofibroblástica levou ao atraso na contração da lesão.

. A fibroplasia é o processo de proliferação e migração do fibroblasto para o coágulo de fibrina e a deposição de proteínas no espaço extracelular que irão constituir a nova matriz (LI *et al.*, 2007). Estudos prévios mostram que a deposição de co-

lágeno é diminuída na área da lesão em animais estressados (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2010; DE ALMEIDA *et al.*, 2013; ROSA *et al.*, 2014) e a organização das fibras colágenas está alterada (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2010). Adicionalmente, estudos *in vitro* demonstraram que altos níveis de catecolaminas atrasam a deposição de colágeno (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2011; ROSA *et al.*, 2014). Em camundongos não estressados, o exercício físico de intensidade baixa (ZHOU *et al.*, 2016) e moderada promove a deposição de fibras colágenas no leito da lesão (ZOGAIB e MONTE-ALTO-COSTA, 2011). De acordo com estes estudos, o estresse diminuiu a deposição de colágeno na área da lesão 10 dias após a lesão. O exercício concomitante ao estresse teve o mesmo efeito, provavelmente pelos altos níveis de normetanefrina liberados. Por outro lado, a prática prévia do exercício ao estresse não apenas reverteu a diminuição de colágeno induzida pelo estresse, como aumentou a razão de colágeno quando comparado ao grupo controle.

Os miofibroblastos são as células responsáveis pela contração da lesão (BROUGHTON *et al.*, 2006). Para isso, os pseudopodos dos miofibroblastos se estendem e a actina citoplasmática dos mesmos se liga à fibronectina extracelular, aderindo às fibras de colágeno e retraem, produzindo a contração da lesão (LI *et al.*, 2007). Sendo assim, para que a contração da lesão ocorra são essenciais a presença dos miofibroblastos e das fibras de colágeno. O estresse atrasou tanto a diferenciação miofibroblastica quanto a deposição de colágeno, levando à contração da lesão atrasada. A prática concomitante de exercício físico e estresse levou à diferenciação miofibroblástica, entretanto atrasou a deposição de colágeno, levando também ao atraso da contração da lesão. Entretanto, a prática de exercício prévia ao estresse reestabeleceu a diferenciação miofibroblástica e a deposição de colágeno na área da lesão, revertendo o atraso na contração causado pelo estresse crônico.

CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados indicam que o exercício físico moderado em concomitância com o estresse potencializa os efeitos deletérios do estresse no reparo tecidual, e quando o exercício é feito apenas antes do estresse os efeitos benéficos são mantidos e é possível reverter o retardo induzido pelo estresse.

Em resumo, os resultados indicam que a prática de exercício prévia ao estresse pode ser uma terapia para atenuar os efeitos adversos do estresse no reparo tecidual, embora novos estudos devam ser realizados para entender os seus mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS

ALTEMUS, M. et al. Stress-induced changes in skin barrier function in healthy women. **J Invest Dermatol,** v. 117, n. 2, p. 309-17,2001.

AMARAL, L. S. et al. Beneficial effects of previous exercise training on renal changes in streptozotocin-induced diabetic female rats. **Exp Biol Med (Maywood),** v. 241, n. 4, p. 437-45,2016.

ARQUER, A. et al. Amount and intensity of physical activity, fitness, and serum lipids in pre-menopausal women. **Int J Sports Med,** v. 27, n. 11, p. 911-8,2006.

ASCHBACHER, K. et al. Chronic stress increases vulnerability to diet-related abdominal fat, oxidative stress, and metabolic risk. **Psychoneuroendocrinology,** v. 46, p. 14-22,2014.

BANDEIRA, L. G. et al. Exogenous Tryptophan Promotes Cutaneous Wound Healing of Chronically Stressed Mice through Inhibition of TNF-alpha and IDO Activation. **PLoS One,** v. 10, n. 6, p. e0128439,2015.

BOWERS, S. L. et al. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. **Brain Behav Immun,** v. 22, n. 1, p. 105-13,2008.

BROUGHTON, G., 2ND; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. **Plast Reconstr Surg,** v. 117, n. 7 Suppl, p. 1e-S-32e-S,2006.

CARDOSO, J. F. et al. Effects of cigarette smoke in mice wound healing is strain dependent. **Toxicol Pathol,** v. 35, n. 7, p. 890-6,2007.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response. **Annu Rev Physiol,** v. 67, p. 259-84,2005.

CHENNAOUI, M. et al. Effects of exercise on brain and peripheral inflammatory biomarkers induced by total sleep deprivation in rats. **J Inflamm (Lond),** v. 12, p. 56,2015.

CHESTER, D.; BROWN, A. C. The role of biophysical properties of provisional matrix proteins in wound repair. **Matrix Biol**,2016.

CHROUSOS, G. P. Stress and disorders of the stress system. **Nat Rev Endocrinol,** v. 5, n. 7, p. 374-81,2009.

DE ALMEIDA, T. F. et al. Nicotine affects cutaneous wound healing in stressed mice. **Exp Dermatol,** v. 22, n. 8, p. 524-9,2013.

DESMOULIERE, A. et al. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. **Am J Pathol,** v. 146, n. 1, p. 56-66,1995.

EMERY, C. F. et al. Exercise accelerates wound healing among healthy older adults: a preliminary investigation. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci,** v. 60, n. 11, p. 1432-6,2005.

EMING, S. A. et al. Differential proteomic analysis distinguishes tissue repair biomarker signatures in wound exudates obtained from normal healing and chronic wounds. **J Proteome Res,** v. 9, n. 9, p. 4758-66,2010.

ERICKSON, K. I.; LECKIE, R. L.; WEINSTEIN, A. M. Physical activity, fitness, and gray matter volume. **Neurobiol Aging,** v. 35 Suppl 2, p. S20-8,2014.

FERREIRA, J. C. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol,** v. 34, n. 8, p. 760-5,2007.

GABBIANI, G.; RYAN, G. B.; MAJNE, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. **Experientia,** v. 27, n. 5, p. 549-50,1971.

GAJENDRAREDDY, P. K. et al. MMP-8 overexpression and persistence of neutrophils relate to stress-impaired healing and poor collagen architecture in mice. **Brain Behav Immun,** v. 28, p. 44-8,2013.

GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Facial Plast Surg Clin North Am,** v. 19, n. 3, p. 441-53,2011.

GOUIN, J. P. et al. The influence of anger expression on wound healing. **Brain Behav Immun,** v. 22, n. 5, p. 699-708,2008.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature,** v. 453, n. 7193, p. 314-21,2008.

HODGSON, A. B. et al. Metabolic response to green tea extract during rest and moderate-intensity exercise. **J Nutr Biochem,** v. 24, n. 1, p. 325-34,2013.

HOPKINS, M. E. et al. Differential effects of acute and regular physical exercise on cognition and affect. **Neuroscience,** v. 215, p. 59-68,2012.

IWATA, M.; OTA, K. T.; DUMAN, R. S. The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. **Brain Behav Immun,** v. 31, p. 105-14,2013.

JACOB, C. et al. Effect of the intensity of training on catecholamine responses to supramaximal exercise in endurance-trained men. **Eur J Appl Physiol,** v. 91, n. 1, p. 35-40,2004.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J,** v. 11, n. 4, p. 447-55,1979.

KEYLOCK, K. T. et al. Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 294, n. 1, p. R179-84,2008.

KIECOLT-GLASER, J. K. et al. Hostile marital interactions, proinflammatory cytokine production, and wound healing. **Arch Gen Psychiatry,** v. 62, n. 12, p. 1377-84,2005.

KIM, T. K.; HAN, P. L. Physical Exercise Counteracts Stress-induced Upregulation of Melanin-concentrating Hormone in the Brain and Stress-induced Persisting Anxiety-like Behaviors. **Exp Neurobiol,** v. 25, n. 4, p. 163-73,2016.

KOHUT, M. L. et al. Aerobic exercise, but not flexibility/resistance exercise, reduces serum IL-18, CRP, and IL-6 independent of beta-blockers, BMI, and psychosocial factors in older adults. **Brain Behav Immun,** v. 20, n. 3, p. 201-9,2006.

KOHUT, M. L. et al. Exercise training-induced adaptations of immune response are mediated by beta-adrenergic receptors in aged but not young mice. **J Appl Physiol (1985),** v. 96, n. 4, p. 1312-22,2004.

KOSCHWANEZ, H. et al. Stress-related changes to immune cells in the skin prior to wounding may impair subsequent healing. **Brain Behav Immun,** v. 50, p. 47-51,2015.

LANDEN, N. X.; LI, D.; STAHLE, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cell Mol Life Sci,** v. 73, n. 20, p. 3861-85,2016.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clin Dermatol,** v. 25, n. 1, p. 9-18,2007.

LUO, B. et al. The effects of moderate exercise on chronic stress-induced intestinal barrier dysfunction and antimicrobial defense. **Brain Behav Immun,** v. 39, p. 99-106,2014.

MARTIN, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. **Science,** v. 276, n. 5309, p. 75-81,1997.

MARUCHA, P. T.; KIECOLT-GLASER, J. K.; FAVAGEHI, M. Mucosal wound healing is impaired by examination stress. **Psychosom Med,** v. 60, n. 3, p. 362-5,1998.

MARVAR, P. J. et al. T lymphocytes and vascular inflammation contribute to stress-dependent hypertension. **Biol Psychiatry,** v. 71, n. 9, p. 774-82,2012.

NASCIMENTO, A. P.; COSTA, A. M. Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. **Br J Nutr,** v. 96, n. 6, p. 1069-77,2006.

NICOLAIDES, N. C. et al. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. **Neuroimmunomodulation,** v. 22, n. 1-2, p. 6-19,2015.

ORITA, K. et al. Strong exercise stress exacerbates dermatitis in atopic model mice, NC/Nga mice, while proper exercise reduces it. **Exp Dermatol,** v. 19, n. 12, p. 1067-72,2010.

PADGETT, D. A.; MARUCHA, P. T.; SHERIDAN, J. F. Restraint stress slows cutaneous wound healing in mice. **Brain Behav Immun,** v. 12, n. 1, p. 64-73,1998.

PASCOE, A. R.; FIATARONE SINGH, M. A.; EDWARDS, K. M. The effects of exercise on vaccination responses: a review of chronic and acute exercise interventions in humans. **Brain Behav Immun,** v. 39, p. 33-41,2014.

PENCE, B. D.; DIPIETRO, L. A.; WOODS, J. A. Exercise speeds cutaneous wound healing in high-fat diet-induced obese mice. **Med Sci Sports Exerc,** v. 44, n. 10, p. 1846-54,2012.

PISANO, J. J. A simple analysis for normetanephrine and metanephrine in urine. **Clin Chim Acta,** v. 5, p. 406-14,1960.

RAMOS, D. S. et al. Low-intensity swimming training partially inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Med Sci Sports Exerc,** v. 42, n. 1, p. 113-9,2010.

RIBEIRO, F. et al. Exercise lowers blood pressure in university professors during subsequent teaching and sleeping hours. **Int J Gen Med,** v. 4, p. 711-6,2011.

ROMANA-SOUZA, B. et al. Gonadal hormones differently modulate cutaneous wound healing of chronically stressed mice. **Brain Behav Immun,** v. 36, p. 101-10,2014.

ROMANA-SOUZA, B.; LIMA-CEZAR, G. S.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Psychological stress-induced catecholamines accelerates cutaneous aging in mice. **Mech Ageing Dev,** v. 152, p. 63-73,2015.

ROMANA-SOUZA, B. et al. Stress-induced epinephrine levels compromise murine dermal fibroblast activity through beta-adrenoceptors. **Exp Dermatol,** v. 20, n. 5, p. 413-9,2011.

ROMANA-SOUZA, B. et al. Rotational stress-induced increase in epinephrine levels delays cutaneous wound healing in mice. **Brain Behav Immun,** v. 24, n. 3, p. 427-37,2009.

ROMANA-SOUZA, B.; PIRES, T. C.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Mate tea-mediated reduction in catecholamine synthesis improves cutaneous wound healing of chronically stressed mice. **Food Res Int,** v. 71, n. 5, p. 32–40,2015.

ROMANA-SOUZA, B.; PORTO, L. C.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Cutaneous wound healing of chronically stressed mice is improved through catecholamines blockade. **Exp Dermatol,** v. 19, n. 9, p. 821-9,2010.

ROSA, A. D. S. et al. Supplementation with olive oil, but not fish oil, improves cutaneous wound healing in stressed mice. **Wound Repair Regen,** v. 22, n. 4, p. 537-47,2014.

SEGERSTROM, S. C.; MILLER, G. E. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. **Psychol Bull,** v. 130, n. 4, p. 601-30,2004.

SIMPSON, R. J. et al. Exercise and the aging immune system. **Ageing Res Rev,** v. 11, n. 3, p. 404-20,2012.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med,** v. 341, n. 10, p. 738-46,1999.

SINNO, H.; PRAKASH, S. Complements and the wound healing cascade: an updated review. **Plast Surg Int,** v. 2013, p. 146764,2013.

SIVAMANI, R. K. et al. Stress-mediated increases in systemic and local epinephrine impair skin wound healing: potential new indication for beta blockers. **PLoS Med,** v. 6, n. 1, p. e12,2009.

SUN, B. K.; SIPRASHVILI, Z.; KHAVARI, P. A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. **Science,** v. 346, n. 6212, p. 941-5,2014.

TANG, X. Y. et al. Effects of exercise of different intensities on the angiogenesis, infarct healing, and function of the left ventricle in postmyocardial infarction rats. **Coron Artery Dis,** v. 22, n. 7, p. 497-506,2011.

TERRA, R. et al. Exercise improves the Th1 response by modulating cytokine and NO production in BALB/c mice. **Int J Sports Med,** v. 34, n. 7, p. 661-6,2013.

TIAN, R. et al. A possible change process of inflammatory cytokines in the prolonged chronic stress and its ultimate implications for health. **ScientificWorldJournal,** v. 2014, p. 780616,2014.

TYMEN, S. D. et al. Restraint stress alters neutrophil and macrophage phenotypes during wound healing. **Brain Behav Immun,** v. 28, p. 207-17,2013.

VILEIKYTE, L. Stress and wound healing. **Clin Dermatol,** v. 25, n. 1, p. 49-55,2007.

WEBSTER MARKETON, J. I.; GLASER, R. Stress hormones and immune function. **Cell Immunol,** v. 252, n. 1-2, p. 16-26,2008.

WOESSNER, J. F., JR. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. **Arch Biochem Biophys,** v. 93, p. 440-7,1961.

ZHOU, W. et al. Low-intensity treadmill exercise promotes rat dorsal wound healing. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci,** v. 36, n. 1, p. 121-6,2016.

ZOGAIB, F. G.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Moderate intensity physical training accelerates healing of full-thickness wounds in mice. **Braz J Med Biol Res,** v. 44, n. 10, p. 1025-35,2011.

ANEXO A – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética para Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG-UERJ)

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/009/2013** sobre **"Exercicio físico moderado: efeito terapêutico no reparo cutâneo de camundongos cronicamente estressados"**, sob a responsabilidade de **Andrea Monte Alto Costa,** 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 Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **27/03/2013.** Este certificado expira em **27/03/2016.**

Rio de Janeiro, 27 de Março de 2013.

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Profª Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva
Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matrícula 34765-8

/.ass

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br

ANEXO B – Planilha detalhada do exercício físico

Sem 1				Sem 2				Sem 3				Sem 4			
Data	DT	IT	A/R	Data	DT	IT	A/R	Data	Data	Data	Data	Data	DT	IT	A/R
Dia 1	5 min	5m/min	-	Dia 6	15 min	8m/min	3'/3'	Dia 11	20 min	8m/min	3'/3'	Dia 16	25 min	8m/min	3'/3'
Dia 2	10 min	5m/min	-	Dia 7	15 min	8m/min	3'/3'	Dia 12	20 min	8m/min	3'/3'	Dia 17	25 min	8m/min	3'/3'
Dia 3	15 min	5m/min	-	Dia 8	20 min	8m/min	3'/3'	Dia 13	25 min	8m/min	3'/3'	Dia 18	30 min	8m/min	3'/3'
Dia 4	15 min	8m/min	3'/3'	Dia 9	20 min	8m/min	3'/3'	Dia 14	25 min	8m/min	3'/3'	Dia 19	30 min	8m/min	3'/3'
Dia 5	15 min	8m/min	3'/3'	Dia 10	20 min	8m/min	3'/3'	Dia 15	25 min	8m/min	3'/3'	Dia 20	30 min	8m/min	3'/3'
Sem 5				Sem 6				Sem 7				Sem 8			
Data	DT	IT	A/R	Data	DT	IT	A/R	Data	DT	IT	A/R	Data	DT	IT	A/R
Dia 21	30 min	8m/min	3'/3'	Dia 26	35 min	8m/min	3'/3'	Dia 31	45 min	8m/min	3'/3'	Dia 36	45 min	8m/min	3'/3'
Dia 22	30 min	8m/min	3'/3'	Dia 27	35 min	8m/min	3'/3'	Dia 32	45 min	8m/min	3'/3'	Dia 37	45 min	8m/min	3'/3'
Dia 23	35 min	8m/min	3'/3'	Dia 28	40 min	8m/min	3'/3'	Dia 33	45 min	8m/min	3'/3'	Dia 38	45 min	8m/min	3'/3'
Dia 24	35 min	8m/min	3'/3'	Dia 29	40 min	8m/min	3'/3'	Dia 34	45 min	8m/min	3'/3'	Dia 39	45 min	8m/min	3'/3'
Dia 25	35 min	8m/min	3'/3'	Dia 30	40 min	8m/min	3'/3'	Dia 35	45 min	8m/min	3'/3'	Dia 40	45 min	8m/min	3'/3'

ANEXO C – Artigo submetido

International Wound Journal

Home

Author

Review

Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to
International Wound Journal

Manuscript ID
IWJ-17-013

Title
Exercise prior to, but not concomitant with stress, reverts delayed skin wound healing induced by stress

Authors
Saguie, Bianca
Romana-Souza, Bruna
Martins, Rayssa
Monte-Alto-Costa, Andréa

Date Submitted
10-Jan-2017