

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

EMERSON ANTONIO BRANCHER

**IMPLICAÇÕES DA INALAÇÃO DE FUMAÇA GERADA PELA QUEIMA
DE COMBUSTÍVEL FÓSSIL SOBRE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS
E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO DURANTE A PRÁTICA
DE EXERCÍCIO FÍSICO**

CRICIÚMA

2018

EMERSON ANTONIO BRANCHER

**IMPLICAÇÕES DA INALAÇÃO DE FUMAÇA GERADA PELA QUEIMA
DE COMBUSTÍVEL FÓSSIL SOBRE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS
E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO DURANTE A PRÁTICA
DE EXERCÍCIO FÍSICO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Paulo Cesar Lock Silveira
Coorientador: Prof. Dr. Jairo José Zocche
Coorientador: Prof. Dr. João Paulo Teixeira

CRICIÚMA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B821i Brancher, Emerson Antonio.
Implicações da inalação de fumaça gerada pela queima de combustível fóssil sobre mediadores inflamatórios e parâmetros de estresse oxidativo durante a prática de exercício físico / Emerson Antonio Brancher. – 2018.
100 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2018.
Orientação: Paulo Cesar Lock Silveira.
Coorientação: Jairo José Zocche, João Paulo Teixeira.

1. Poluição atmosférica. 2. Inalação da fumaça da queima de combustíveis fósseis – Efeitos colaterais. 3. Exercícios físicos. 4. Estresse oxidativo. 5. Dano ao DNA. I. Título.

CDD 23. ed. 615.902



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato Emerson Antônio Brancher sob o título “IMPLICAÇÕES DA INALAÇÃO DE FUMAÇA GERADA PELA QUEIMA DE COMBUSTÍVEL FÓSSIL SOBRE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO DURANTE A PRÁTICA DE EXERCÍCIO FÍSICO”, para obtenção do grau de DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela “APROVAÇÃO” da Tese.


Criciúma, SC, 07 de dezembro de 2018.


Prof. Dr. RICARDO ANDRÉZ MACHADO DE ÁVILA
Membro Relator – UNESC


Prof. Dr. ALEXANDRE PASTORIS MÜLLER
Membro Interno – UNESC


Prof. Dr. JONI MÁRCIO DE FARIAS
Membro Externo – UNESC


Prof. Dr. OSCAR BRUNA ROMERO
Membro Externo – UFSC


Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira
Orientador


Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador Adjunto do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo a resolução 07/2015 e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar condições para alcançar meus objetivos.

A Universidade Regional de Blumenau (FURB), ao Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior (FUMDES), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) por proporcionarem as condições para o desenvolvimento do programa de Doutorado.

Aos professores Dr. Paulo Cesar Lock Silveira e Dr. Ricardo Pinho e pela amizade, companheirismo, serenidade e sinceridade na orientação deste estudo, estando sempre presente e se tornando peças imprescindíveis na realização do trabalho.

Ao professor João Paulo Teixeira (Coorientador) pela acolhida, oportunidade e amizade durante os meses que estive em Portugal.

Aos professores do Programa de Doutorado em Ciências da Saúde pelos conhecimentos transmitidos, em especial aos professores Jairo José Zocche (Coorientador) Ricardo Andrez, Alexandre Partoris Muller, Claudio Teodoro de Souza, Ricardo Rico, Vanessa Andrade de Moraes, Renata Tiscoski Nesi.

Aos alunos de doutorado, mestrado e iniciação científica que auxiliaram no desenvolvimento deste estudo Adriani Paganini Damiani, Nathalia Coral Galvani, Bruno Luiz da Silva Pieri, Gustavo de Bem Silveira, Matheus Scarpato Rodrigue, Barbara Costa, Silvia de Carvalho Scarpato, Bruna Barros Fernandes, Giulia dos Santos Pedroso Fidelis, Helen Rebelo Sorato, Hemelin Resende Farias, Lara Bellettini Paganini, Pauline Souza Effting, Paulo Roberto Lino da Silva, Priscila Soares de Souza Victo, Thais Fernandes Luciano, Daniela Pacheco dos Santos Haupenthal, Fernando Milanes Dias, Carolini Mendes, Laura de Roch Casagrande, Ligia Milanes Venturini, Maria Eduarda Correia, Rubia Pereira Zancaron.

A toda a equipe do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Heron Sangaletti Pereira, Deivid Borges Paulino, Alexandra Graziela de Souza Martins e Elige Roldao Nazario.

A equipe de funcionários da manutenção da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Gustavo Nunes Fortuna, Rafael Gomes Patricio, Jonas Miot, Jonas Cardoso Fernandes, Diego Ugioni Pinto, Junior da Luz Candido, Samuel, Welinton, que não mediram esforços para a elaboração e desenvolvimento do projeto da caixa para exposição e inalação de poluentes.

Aos colegas do Programa de Doutorado em Ciências da Saúde que tornaram o curso muito especial. Aos funcionários da Universidade do Extremo Sul Catarinense pelo apoio e atenção dispensados, e,

Meu agradecimento todo especial ao meu filho Emerson Matheus Brancher, pela atenção e amor dispensados e compreensão pelos momentos distantes de casa.

A todos meus mais sinceros agradecimentos...

RESUMO

A exposição prolongada a poluição atmosférica tem sido considerada um fator de risco para diversas doenças. Nesse contexto, a prática regular de exercícios físicos nesses ambientes pode apresentar efeitos adversos ao organismo ao aumentar o metabolismo celular de quem pratica. O exercício físico acaba por acelerar a absorção orgânica dos agentes nocivos presentes no ambiente atmosférico e, desta forma, contribuir para os danos no organismo induzidos pela poluição do ar. O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da inalação da fumaça gerada pela queima de combustível fóssil sobre os parâmetros histopatológicos, de estresse oxidativo e dano em DNA no pulmão de animais participantes de um programa de treinamento físico aeróbio expostos a diferentes concentrações de poluição ambiental. Para isso, camundongos Swiss machos de 60 dias de idade foram expostos, em uma câmara de exposição e inalação de poluentes, à diferentes concentrações de partículas de exausta de diesel (DEP) S500, nas concentrações de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e ao treinamento físico aeróbio (5 sessões semanais de 60 minutos em esteira com a velocidade de 0,8-1,2 km/h). Após 8 semanas experimentais os animais foram eutanasiados, sendo coletados amostras de lavado broncoalveolar, sangue e pulmões, processados para análise dos parâmetros histopatológicos, produção de oxidantes celulares (2',7'-diclorodihidrofluoresceína, DCF e malondealdeído, MDA), produção de antioxidantes (SOD, CAT e sistema glutaciona), marcadores pró-inflamatórios (TNF α , IL-1 β e IL-6), Akt e avaliação de índice e frequência de dano em DNA. Os resultados mostraram que quando comparado camundongos exercitados com camundongos não exercitados expostos as mesmas concentrações de DEP, o exercício físico não potencializou o processo de alargamento alveolar e espessamento de septo, o qual pode causar redução da capacidade respiratória, não aumentou o dano oxidativo em lipídio, reduziu a atividade pró-inflamatória da IL-1 β , e reduziu o índice e frequência de dano em DNA. Os resultados do presente estudo indicam que a exposição a ambientes poluídos aumenta a sensibilidade dos tecidos corporais às alterações do sistema redox e promove dano em DNA, entretanto, essas alterações são dependentes das concentrações de poluente no ambiente e ao tempo de exposição. Indicam ainda que o exercício físico aeróbico não potencializa o efeito da poluição por DEP no metabolismo de camundongos e reduz o estado inflamatório e dano em DNA.

Palavras chave: Poluição atmosférica; Material particulado; Partículas de exaustão de diesel (DEP); Exercício físico; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Prolonged exposure to air pollution has been considered a risk factor for several diseases. In this context, the regular practice of physical exercises in these environments can present adverse effects to the body by increasing the cellular metabolism of those who practice. The physical exercise eventually accelerates the organic absorption of the harmful agents present in the atmospheric environment and, thus, contributes to the damages in the organism induced by the air pollution. The objective of this study was to investigate the effects of inhalation of smoke generated by fossil fuel burning on the histopathological parameters of oxidative stress and DNA damage in the lung of animals participating in an aerobic physical training program exposed to different concentrations of pollution environmental. For this purpose, 60 day old male Swiss mice were exposed to different concentrations of diesel exhaust particles (DEP) S500 in an concentrations of 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ and 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in exposure chamber and inhalation of pollutants and aerobic physical training (5 weekly sessions of 60 minutes on a treadmill with a velocity of 0.8-1.2 km/h). After 8 experimental weeks, the animals were euthanized and samples of bronchoalveolar lavage, blood and lungs were collected, analyzed for histopathological parameters, production of cellular oxidants (2',7'-dichlorodihydrofluorescein, DCF and malondealdehyde, MDA), antioxidant production (SOD, CAT and glutathione system), proinflammatory markers (TNF α , IL-1 β and IL-6), Akt, and evaluation of index and frequency of DNA damage. The results showed that, when compared to mice exercised with non-exercised mice exposed to the same concentrations of DEP, physical exercise did not potentiate the process of alveolar enlargement and septal thickening, which may cause reduction of respiratory capacity, did not increase oxidative damage in lipid, reduced the proinflammatory activity of IL-1 β , and reduced the rate and frequency of DNA damage. The results of the present study indicate that exposure to polluted environments increases the sensitivity of body tissues to changes in the redox system and promotes DNA damage; however, these alterations are dependent on concentrations of pollutants in the environment and time of exposure. They also indicate that aerobic physical exercise does not potentiate the effect of DEP pollution on the metabolism of mice and reduces the inflammatory state and DNA damage.

Keywords: Air pollution; Particulate matter; Diesel exhaust particles (DEP); Physical exercise; Oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de Variância

Akt (1,2 e 3) - Proteína quinase B (do inglês *Protein Kinase B*)

As - Arsênio

CAT - Catalase

Cd - Cádmiio

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

COHb -Carboxihemoglobina

COMEAP - Committee on the Medical Effects of Air Pollutants

Cr - Cromo

CVF - capacidade vital forçada

DCF - Diclorofluoresceína

DCFH - Diclorohidrofluoresceína

DCFH-DA - 2'7'diacetato de Diclorofluoresceína

DEP - Partículas de exaustão de diesel

DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

DNAmt - DNA mitocondrial

EC – Ensaio cometa

EEA - Agência Europeia do Ambiente

EO – Estresse oxidativo

EPM - Erro Padrão da Média

ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO- Espécies Reativas de Oxigênio

FEF – Fluxos de expiração forçada

FEV – Volume expiratório forçado

FD - Frequência de danos

FPG - formamino pirimidina glicosilase

GPx - Glutathione Peroxidase

GR - Glutathione Redutase

GSH - Glutathione Reduzida

GSSG - Glutathiona Dissulfeto

Hb - Hemoglobina

HC – Hidrocarbonetos

HE - Hematoxilina e Eosina

HO-1 - Heme oxigenase 1 (do inglês *Heme oxygenase-1*)

HPA - Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Resolução (do inglês High Performance Liquid Chromatograph)

ID – Índice de Danos

IL-6 – Interleucina-6

IL-1 β - Interleucina-1 β

IMAGEJ – Processador e analisador de imagem em Java (do inglês *Image processing and analysis in Java*)

IMC – Índice de Massa Corporal

iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzível (do inglês *Glucose Inducible Nitric Oxide Synthase*)

LBA – Lavado broncoalveolar

MDA - Malondialdeído

MP - Material particulado

MP_{0,1} - Material particulado $\leq 0,1 \mu\text{m}$ em diâmetro aerodinâmico

MP₁ – Material particulado em suspensão $\leq 1 \mu\text{m}$ em diâmetro aerodinâmico ou partículas ultrafinas

MP_{2,5} - Material particulado $\leq 2,5 \mu\text{m}$ em diâmetro aerodinâmico

MP₁₀ - Material particulado $\leq 10 \mu\text{m}$ em diâmetro aerodinâmico

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADPH- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, do inglês Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate.

NOQ1 - NAD(P) quinona oxidoreductase-1 (do inglês *NADPH dehydrogenase quinone 1*)

Nrf2 - Fator Nuclear Derivado de Eritrócitos do Tipo 2 (do inglês *Nuclear Factor Erythroid 2–Related Factor 2*)

OGG1 - DNA glicosilase de 8-oxoguanina (do inglês *8-oxoguanine DNA glycosylase*)

p38MAPK - Proteína Quinase Ativadora de Mitógeno (do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinases*)

Pb - Chumbo

PBS - Tampão Fosfato de Sódio (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)

PCR- *Proteína C Reativa* (do inglês *C-Reactive Protein*)

PFA - paraformaldeído

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase (do inglês *Phosphoinositide 3-Kinase*)

PP2 α - Proteína Fosfatase 2 alfa (do inglês *Protein Phosphatase 2 alpha*)

PTB1B - Proteína Tirosina Fosfatase (do inglês *Protein Tyrosine Phosphatase 1B*)

PTEN - Fosfatase Homóloga a Tensina (do inglês *Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10*)

PPM – Partes por milhão

RL- Radicais livres

SOD - Superóxido Dismutase

TLR4 - Receptor *Toll Like 4* (do inglês *Toll-like Receptor 4*)

TNFR1 - Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral α (do inglês *Tumor Necrosis Factor Receptor 1*)

TNF α - Fator de Necrose Tumoral α (do inglês *Tumor Necrosis Factor Alpha*)

UNESC - Universidade do Extremo Sul Catarinense

UFP – Partículas ultrafinas (do inglês *Ultrafine particles*)

VOC - Compostos orgânicos voláteis (do inglês *Volatile Organic Compounds*)

VE - Ventilação

WB - Western Blot

WHO - Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*)

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xiv
LISTA DE QUADROS	xv
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 COMBUSTÍVEIS FÓSSEIS E POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA.....	17
1.2 EFEITOS BIOLÓGICOS DA INALAÇÃO DA FUMAÇA DA QUEIMA DE COMBUSTÍVEIS.....	20
1.3 IMPLICAÇÕES DA INALAÇÃO DA FUMAÇA DA QUEIMA DE COMBUSTÍVEIS DURANTE A REALIZAÇÃO DE EXERCÍCIO FÍSICO.....	25
1.4 EFEITOS INFLAMATÓRIOS E OXIDATIVOS DA INALAÇÃO DE DEP.....	30
1.5 JUSTIFICATIVA.....	35
2 OBJETIVOS	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS.....	38
3.2 PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DO POLUENTE	38
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	42
3.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO.....	43
3.5 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.....	44
3.6 MÉTODO HISTOLÓGICO.....	45
3.7 ENSAIOS MOLECULARES E BIOQUÍMICOS.....	45
3.7.1 Determinação de proteínas	45
3.7.2 Avaliação das espécies reativas	45
3.7.2.1 Diclorohidrofluoresceína (DCFH)	45
3.7.3 Marcadores de danos oxidativos	46
3.7.3.1 Malondialdeído (MDA)	46
3.7.4 Marcadores das defesas antioxidantes	47
3.7.4.1 Superóxido dismutase (SOD)	47
3.7.4.2 Atividade da catalase (CAT)	47

3.7.4.3 Dosagem de GSH/GSSG	47
3.7.5 Marcadores inflamatórios	48
3.7.5.1 Dosagens de Citocinas	48
3.7.5.2 Contagem de células em câmara de Neubauer	48
3.7.6 Expressão da proteína Akt	49
3.7.7 Ensaio de genotoxicidade	50
3.7.7.1 Ensaio cometa alcalino.....	50
3.7.7.2 Ensaio Cometa com tratamento enzimático.....	51
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
4 RESULTADOS.....	52
5 DISCUSSÃO.....	65
6 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS.....	80
APENDICES.....	96
ANEXOS	100

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Como o material particulado afeta os pulmões e pode levar ao câncer de pulmão.	22
Figura 2 - Mecanismo proposto para efeito pró-inflamatório derivado de DEP.	33
Figura 3 - Motor Toyama TD 7000 CXE em seu local de funcionamento.	36
Figura 4 - Caixa para inalação de poluentes.	37
Figura 5 - Posição do monitor de partícula DustTrack DRX no interior da caixa para inalação de poluentes.	38
Figura 6 - Analisador de gases de combustão Sonda de até 500°C Testo 310.	39
Figura 7 – Filtro para coleta de material particulado.	39
Figura 8 – Controlador de temperatura COEL TZ11 digital.	39
Figura 9 – Termo higrômetro da marca incoterm modelo 7666.02.0.00.	40
Figura 10 - Composição dos grupos de estudo.	41
Figura 11 - Cortes histológicos de tecido pulmonar corados em H&E	51
Figura 12 - Quantificação estereológica do diâmetro alveolar.	52
Figura 13 A - Contagem total de leucócitos em amostras de LBA de camundongos expostos a DEP.	53
Figura – 13 B - Espécies reativas de oxigênio em LBA de camundongos expostos a DEP.	53
Figura 14 - Efeitos da exposição ao DEP sobre o sistema oxidante em pulmão de camundongos.	54
Figura 15 (A-E) - Efeitos da exposição ao DEP sobre o sistema antioxidante em pulmão de camundongos.	56
Figura 16 - Efeitos da exposição ao DEP sobre moléculas envolvidas no processo inflamatório em pulmão de camundongos.	57
Figura 17 - Efeitos da exposição ao MP 1 sobre a expressão da proteína Akt total em pulmão de camundongos.	58
Figura 18 - Avaliação de genotoxicidade devido a exposição ao DEP em sangue de camundongos expostos as concentrações de 500 µg/m ³ , 1.000 µg/m ³ e 2.000 µg/m ³ (4 semanas).	59
Figura 19 - Avaliação de genotoxicidade devido a exposição ao DEP em sangue de camundongos expostos as concentrações de 500 µg/m ³ , 1.000 µg/m ³ e 2.000 µg/m ³ (8 semanas).	59
Figura 20 - Comparação de genotoxicidade entre 1 ^a e 2 ^a coletas de sangue nas concentrações de 500 µg/m ³ , 1.000 µg/m ³ e 2.000 µg/m ³ em camundongos expostos ao DEP.	61
Figura 21 - Efeitos da exposição ao MP 1 no pulmão de camundongos expostos as concentrações de 500 µg/m ³ , 1.000 µg/m ³ e 2.000 µg/m ³ .	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Registro da Concentração de PM 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	95
Quadro 2 – Registro da Concentração de PM 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	96
Quadro 3 – Registro da Concentração de PM 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	97

1 INTRODUÇÃO

Com o crescimento econômico, a emissão antrópica de gases e partículas tende a intensificar-se progressivamente, levando ao aumento de sua concentração na atmosfera (Santana et al., 2012). O relatório da Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization* (WHO) publicado em maio de 2016 aponta que mais de 80% das pessoas que vivem em áreas urbanas que possuem monitoramento da poluição do ar estão expostos a níveis que excedem os limites estabelecidos. Embora todas as regiões do mundo sejam afetadas pela poluição atmosférica, as populações que residem em cidades de baixa renda são as mais impactadas (WHO, 2016).

Para o conselho nacional do meio ambiente, poluição atmosférica é qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos em legislação, e que tornem ou possam tornar o ar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, inconveniente ao bem-estar público, danoso aos materiais, à fauna e à flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade (CONAMA, 1990).

Estudos relacionados à poluição atmosférica e a qualidade do ar crescem a cada ano com o desenvolvimento de pesquisas que envolvem o conhecimento sobre os componentes nocivos à saúde presentes no meio ambiente (Castro, Araújo e Silva, 2013).

Para Santana et al., (2012), identificar os principais contaminantes e efeitos deletérios da poluição atmosférica constituem-se na referência básica para o estabelecimento de padrões de qualidade do ar. Segundo Braga et al. (2002), os poluentes atmosféricos são principalmente gases, (formados por substâncias gasosas e vapores) e material particulado (formados por substâncias sólidas e líquidas em suspensão).

A WHO que tem como uma de suas principais atividades a definição de diretrizes gerais para a condução das políticas públicas nacionais de saúde, recomenda o monitoramento no controle de emissão de material particulado (MP) de 2,5 e 10 micra (MP_{2,5} e MP₁₀), ozônio (O₃), dióxido de enxofre (SO₂), dióxido de nitrogênio (NO₂) e monóxido de carbono (CO), devido aos impactos que causam sobre a atmosfera a vegetação, a saúde humana, aos animais e aos materiais (WHO, 2005).

Segundo Mills et al. (2009), os poluentes atmosféricos considerados potencialmente prejudiciais à saúde incluem MP, dióxido de nitrogênio, ozônio, dióxido de enxofre e compostos orgânicos voláteis.

As emissões de poluentes atmosféricos são classificadas em naturais e antropogênicas (resultantes da atuação humana). As emissões de fontes naturais são oriundas de atividades vulcânicas, emissão de metano pela digestão dos animais, liberação de grande quantidade de dióxido de carbono pelos incêndios florestais e as provenientes de fontes antropogênicas originam-se de emissões de gases poluentes pelas indústrias, liberação de poeira pelas fábricas e madeireiras, queima de combustíveis fósseis como o carvão e petróleo nas indústrias, e, a emissão de diversos gases e partículas resultantes da combustão de veículos automotores (Cavalcanti, 2010).

1.1 COMBUSTÍVEIS FÓSSEIS E POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA

Um dos principais fatores que contribuem para a poluição do ar é a combustão de combustíveis fósseis (Guarieiro, Vasconcellos e Solci, 2011) sendo que, os mais conhecidos são: gasolina, óleo diesel, gás natural e carvão mineral. A queima destes combustíveis é usada para gerar energia e movimentar motores de máquinas, veículos e até mesmo gerar energia elétrica (no caso das usinas termoelétricas). Os veículos automotores e as atividades industriais estão ligados diretamente a problemas ambientais e de saúde pública, uma vez que são os principais responsáveis pela presença dos mais variados compostos na atmosfera (Castro, Araújo e Silva, 2013).

O óleo diesel é utilizado principalmente em veículos rodoviários (automóveis, furgões, ônibus e caminhões) para transporte de cargas e de passageiros, em pequenas embarcações, na indústria, na geração de energia, em máquinas para a construção civil e agrícolas, bem como nas locomotivas (Santana, 2015).

Em ambientes urbanos, a exaustão dos veículos a diesel é uma importante fonte de partículas de diferentes magnitudes de tamanho, classificadas como grossas, finas e ultrafinas (Guarieiro, Vasconcellos e Solci, 2011). Partículas de escapamento de diesel (DEP) são partículas respiráveis ultrafinas com diâmetro médio $<2,5 \mu\text{m}$ e contêm vários hidrocarbonetos mutagênicos e carcinogênicos (Arlt et al., 2003).

A queima de diesel pode emitir partículas com conteúdo composto de material parcialmente queimado, matéria orgânica do combustível e do óleo lubrificante, carbono elementar, sulfatos, mercaptanas, óxidos metálicos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA, nitro-HPA), compostos reduzidos de enxofre, entre outros componentes (Corrêa e Arbillá, 2008).

Os poluentes provenientes de emissões veiculares podem ser divididos em compostos regulamentados, tais como: monóxido de carbono (CO), dióxidos de nitrogênio (NO₂), hidrocarbonetos (HC), óxidos de enxofre (SO₂) e MP, e aqueles que ainda não são regulamentados tais como: compostos contendo carbonila, hidrocarbonetos aromáticos leves, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), nitro-HPAs, óxido nitroso (N₂O), amônia (NH₃), formaldeído (HCHO), entre outros, tendo alguns destas características tóxicas quando inalados pelo ser humano (Santana, 2015).

Muitos compostos orgânicos voláteis (VOC) são classificados como carcinogênicos, irritantes e tóxicos para humanos (U.S. Environmental Protection Agency, 2012), e tem sido associado a asma e outros sintomas de doenças respiratórias (Paciência et al., 2016).

Os compostos regulamentados possuem recomendações quanto à adoção de normas e padrões e valores expressos de sua concentração no ar, para oferecer proteção as condições de saúde da população (Santana et. al., 2012).

Destacam-se como principais constituintes da queima de combustíveis fosseis o CO, O₃, MP, NO₂ e o dióxido de enxofre (SO₂) (Santana, 2015).

O CO é um gás tóxico, incolor, inodoro, que é produzido principalmente a partir da combustão incompleta de combustíveis que contêm carbono oriundos de processos industriais e nas emissões veiculares (Giles e Koehle, 2014). Fontes externas comuns de CO incluem os fumos de escape de automóveis (gasolina e diesel), equipamentos de combustão estacionária como centrais de aquecimento, fumaça de incêndios e os motores movidos a gás. Ao ar livre, as concentrações são mais altas perto de escapamentos de carros, congestionamentos e cruzamentos (CETESB, 2016).

O NO₂ é formado pela reação do óxido de nitrogênio e do oxigênio presentes na atmosfera (CETESB, 2016). As principais fontes de óxido nítrico (NO) e dióxido de nitrogênio são os motores dos automóveis, as usinas termoelétricas, indústrias, fogões a gás, aquecedores que utilizam querosene (mais frequentes em regiões frias)

e o cigarro (Cançado, 2006). O dióxido de nitrogênio, na presença de luz solar, reage com hidrocarbonetos e oxigênio formando ozônio, sendo um dos principais precursores deste poluente na troposfera. As principais fontes de emissão e concentrações de NO_2 se correlacionam com as áreas com alta distribuição geográfica dos principais aglomerados urbanos (Carlisle e Sharp, 2001).

O ozônio (O_3) é um dos principais poluentes relacionando a qualidade do ar e a saúde humana (Querol et al., 2016), é um oxidante fotoquímico formado na atmosfera por reações químicas envolvendo poluentes orgânicos, óxidos de nitrogênio, oxigênio e luz solar (CETESB, 2016). Aproximadamente 97% da população europeia está exposta a níveis de O_3 que excedem a orientação da WHO para a proteção da saúde humana (EEA, 2015). A ocorrência de níveis mais altos do poluente está associada ao tráfego urbano, instalações industriais e as ondas de calor durante o verão (Querol et al., 2016).

O dióxido de enxofre (SO_2) é um gás incolor, com forte odor, semelhante ao gás produzido na queima de palitos de fósforos formado pela reação do oxigênio com o enxofre contido nos combustíveis industriais (óleos combustíveis) ou automotivos (óleo diesel e gasolina) (CETESB, 2016). Pode ser transformado a trióxido de enxofre (SO_3), que na presença de vapor de água, passa rapidamente a ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Santana, 2015). É um dos principais responsáveis pela formação da chuva ácida e pode reagir com outras substâncias presentes no ar, formando partículas de sulfato, que são responsáveis pela redução de visibilidade na atmosfera e contribuem para a formação de MP (CETESB, 2016). É oriundo de processos que utilizam queima de óleo combustível, refinarias de petróleo, veículos a diesel, produção de polpa de celulose e papel e fertilizantes.

A poluição por material particulado proveniente de fontes antropogênicas ou naturais contém material biológico, compostos orgânicos, hidrocarbonetos, aerossóis ácidos e metais ligados a um núcleo de carbono (Veras, 2012). São constituídas de poeiras, fumaças e todo tipo de material sólido e líquido que se mantém suspenso na atmosfera por causa de seu pequeno tamanho (Baird, 2002). Os diâmetros das partículas atmosféricas abrangem uma gama muito elevada de tamanhos, variando de 1 nm a 100 μm . Além disso, essas partículas têm diferentes comportamentos, propriedades físicas e efeitos sobre o meio ambiente e sobre a saúde humana (Resende, 2007). Para Costa et al. (2014), MP entre 0,1 μm e 1 μm de diâmetro podem

permanecer na atmosfera por dias ou semanas e, possuem longo alcance devido ao transporte pelo ar.

Segundo Guarieiro, Vasconcellos e Solci (2011), o MP age como núcleo de condensação de nuvens, podendo modificar o clima em escala local e global, afetam a visibilidade atmosférica, podendo absorver ou espalhar a radiação solar, agindo ainda como transportadoras de substâncias poluentes para ecossistemas terrestres e aquáticos.

A queima de combustíveis fósseis, materiais asfálticos ou madeiras, produzem as fumaças, que contêm fuligem (partículas líquidas) e, no caso de madeira e carvão, uma fração mineral (cinzas). São caracterizadas por partículas de diâmetro muito pequeno (Resende, 2007).

O MP constituinte da queima de óleo diesel apresenta uma estrutura bastante complexa, a qual depende de vários fatores, como o tipo de máquina, do modo de operação além, da qualidade do óleo lubrificante e do próprio diesel utilizado. O MP produzido por uma máquina diesel consiste, basicamente, de aglomerados de núcleos de carbono, de hidrocarbonetos, SO₃ ou ácido sulfúrico, e água, adsorvidos ou condensados sobre esses núcleos carbônicos (Braun, Appel e Schmal, 2003).

Atualmente, em algumas cidades brasileiras o controle do MP é feito pelo monitoramento das partículas totais em suspensão, da fumaça e do particulado inalável, entretanto, a legislação brasileira ainda não estabeleceu padrões para as partículas respiráveis, de diâmetro inferior a 2,5 µm (CETESB, 2016).

1.2 EFEITOS BIOLÓGICOS DA INALAÇÃO DA FUMAÇA DA QUEIMA DE COMBUSTÍVEIS

Os gases e partículas proveniente da fumaça da queima de combustíveis fósseis, têm efeitos comprovados na saúde humana e no meio ambiente, razão pela qual são considerados poluentes atmosféricos (Santana et. al., 2012). Quando absorvidos isoladamente ou em associação pelo organismo esses elementos comprometem a saúde humana. A poluição do ar tem sido associada a doenças cardiovasculares, doenças isquêmicas do coração, câncer e o desenvolvimento de doenças respiratórias, incluindo infecções respiratórias agudas e doenças pulmonares

obstrutivas crônicas (Cheng, Tsai e Yang, 2009; Chiu e Yang, 2009; Beckerman et al., 2012; WHO, 2014; Oliveira et al., 2014).

Para Costa et al (2014), a poluição do ar pode influenciar diferentes elementos da função cardíaca: sistema nervoso autônomo, substrato miocárdico e vulnerabilidade miocárdica. Um desequilíbrio na função do sistema nervoso autônomo é, por exemplo, refletido por mudanças na variabilidade da frequência cardíaca (VFC). Alterações no substrato miocárdico compreendem lesão miocárdica, isquemia ou hipertrofia. Isso pode levar ao aumento da morbidade e, posteriormente, a eventos cardíacos fatais. A vulnerabilidade miocárdica reflete o conceito de que algumas pessoas têm maior probabilidade de apresentar resultados adversos, como arritmias cardíacas ou isquemia transitória. A exposição a longo prazo está associada a impactos adversos para a saúde, como sintomas respiratórios, aumento da morbidade e mortalidade (Hoek et al., 2013).

Os principais efeitos biológicos a saúde humana da inalação de fumaça são oriundos do monóxido de carbono, o ozônio, o MP, o dióxido de nitrogênio (NO_2) e o dióxido de enxofre (SO_2). Segundo Giles e Koehle (2014), o monóxido de carbono exerce um efeito tóxico e tem uma afinidade de 210-240 vezes maior para a hemoglobina (Hb) em comparação com o O_2 . Aproximadamente 80-90% de monóxido de carbono absorvido durante a respiração liga-se com a Hb para formar carboxihemoglobina (COHb), que reduz a capacidade de transporte de O_2 do sangue (Guarheiro, Vasconcellos e Solci, 2011), levando à hipóxia tecidual e está associado com a mortalidade por infarto do miocárdio (Castro, Araújo e Silva, 2013). A exposição ao monóxido de carbono também pode resultar em um ambiente celular pró-oxidante, bem como afetar os componentes da cadeia respiratória mitocondrial, o que leva, a uma produção de energia atenuada, causando lesão ou disfunção celular (Giles e Koehle, 2014).

O dióxido de nitrogênio é um poluente que causa irritabilidade aos olhos, nariz e mucosas. Além desses problemas de irritabilidade, o NO_2 provoca uma série de graves doenças respiratórias como enfisema pulmonar, bronquites, traqueítes e em casos mais graves, câncer (Castro, Araújo e Silva, 2013). Além dos efeitos diretos à saúde, o dióxido de nitrogênio também está relacionado à formação do ozônio e da chuva ácida (CETESB, 2016).

Estudos realizados por Vieira et al. (2011) em crianças da zona urbana de São Paulo, Brasil, mostram que os níveis de NO_2 presentes no ar provocam sintomas

tipicamente associados a doenças respiratórias. Toda a população estudada apresentou sibilo, ruído semelhante a um assobio agudo característico da asma, em alguma etapa do estudo realizado. Neste estudo constatou-se que 45,8% dos casos tiveram uma evolução para o diagnóstico de asma.

O ozônio (O_3) é um gás desagradável, e embora auxilie na redução da radiação solar, pode ser prejudicial à saúde (Fernando, Hall, e Jha, 2006). Pode causar irritação do nariz e garganta, tosse, chiado, falta de ar, e uma incapacidade de respirar fundo devido a dor torácica subesternal ou constrição (Carlisle e Sharp, 2001). Hazucha, Bates e Bromberg (1989), sugerem que a inalação de O_3 estimula os receptores localizados nas camadas do músculo liso das vias aéreas superiores e que a contração da musculatura inspiratória é limitada. O efeito líquido no pulmão humano é a inibição involuntária de plena inspiração, redução da pressão transpulmonar, capacidade inspiratória e aumento da resistência ao fluxo. Há uma diminuição nas taxas de expiração máxima de fluxo e capacidade vital acompanhadas de dor subesternal e tosse. A diminuição do volume corrente e aumento da frequência respiratória associada à exposição O_3 causa hiperventilação relativa (Carlisle e Sharp, 2001). Altas temperaturas podem agravar ainda mais o impacto negativo de O_3 sobre a função pulmonar (Cheng et al., 2014).

Estudos de séries temporais da WHO atribuem ao ozônio o aumento da mortalidade diária na faixa de 0,3 a 0,5% para cada $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ nas concentrações médias de 8 horas a partir de $70 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (WHO, 2005).

O dióxido de enxofre em baixas concentrações, pode provocar espasmos dos músculos lisos dos bronquíolos pulmonares, e, em altas concentrações, causa aumento da secreção na mucosa das vias aéreas superiores, provocando inflamação intensa nessa região (CETESB, 2016). Para Carlisle e Sharp (2001), os sintomas associados à asma são exacerbados pelo SO_2 . Asmáticos são geralmente dez vezes mais sensíveis ao SO_2 do que os não-asmáticos (Greenberg et al., 2016), especialmente quando no exercício. Além disso, o SO_2 apresentou uma relação com mortes por infarto do miocárdio na cidade de São Paulo (Sharovsky, Lam e Jaf, 2004).

O material particulado afeta a saúde humana de várias maneiras, podendo gerar irritação dos olhos e das vias respiratórias, redução da capacidade pulmonar, redução da performance física, agravamento de doenças crônicas do aparelho respiratório, dentre outras (WHO, 2003). Por meio da respiração, as partículas

alcançam desde as narinas até os alvéolos pulmonares, provocando processos inflamatórios que debilitam o sistema respiratório (CETESB, 2016).

Dependendo do seu tamanho, as partículas podem se instalar em diferentes regiões do sistema respiratório. As partículas inaláveis grossas (fração inalável) são as que possuem o diâmetro entre 2,5 e 10 μm ($\text{MP}_{2,5}$ e MP_{10}) e as partículas finas ou respiráveis (fração torácica) são as inferiores a 2,5 μm ($\text{MP}_{2,5}$) (Guarieiro, Vasconcellos e Solci, 2011).

Conforme COMEAP (1995), das diferentes faixas de tamanho do material particulado, as partículas grossas são menos prejudiciais à saúde humana, pois sedimentam rapidamente, reduzindo a exposição humana por inalação. Quando inaladas, são filtradas nos pelos do nariz ou retidas na garganta, entretanto, por se acumularem nas vias aéreas superiores, em pessoas com deficiência respiratória geram problemas como a asma. As partículas finas, de diâmetro inferior a 2,5 μm , chegam aos brônquios e aos alvéolos pulmonares (Castanho, 1999) e possuem maior capacidade de adsorver e transportar poluentes com efeitos tóxicos e carcinogênicos até o trato respiratório, tais como metais tóxicos (Quitério et al., 2004), além de moléculas orgânicas de grandes dimensões e baixas pressões de vapor, onde podem reagir ou catalisar reações bioquímicas (Baird, 2002).

Partículas de exaustão de diesel são os principais componentes de materiais particulados ambientais, incluindo hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs), metais pesados e materiais gasosos. Muitos estudos epidemiológicos, clínicos e toxicológicos mostraram que partículas ambientais, incluindo DEP, estão associadas a distúrbios respiratórios, como asma, rinite alérgica e câncer de pulmão (Donaldson et al., 2005; Laks et al., 2008; Park et al., 2011).

Pesquisadores europeus e americanos conduziram vários estudos baseados de coorte para examinar a relação potencial entre o MP e o câncer de pulmão e encontraram uma associação positiva entre a MP e a mortalidade por câncer de pulmão (Li e Gao, 2014). Partículas de exaustão de diesel (DEP) foram classificadas como carcinogênicos para seres humanos pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC, 2014). Como mostra a Figura 1, existem vários mecanismos potenciais pelos quais o MP pode influenciar a saúde pulmonar, tais como citotoxicidade induzida por estresse oxidativo, geração de radicais livres de oxigênio, mutagenicidade ou dano oxidativo ao DNA, e estimulação de fatores pró-inflamatórios (Valavanidis, Fiotakis, Vlachogianni, 2008).

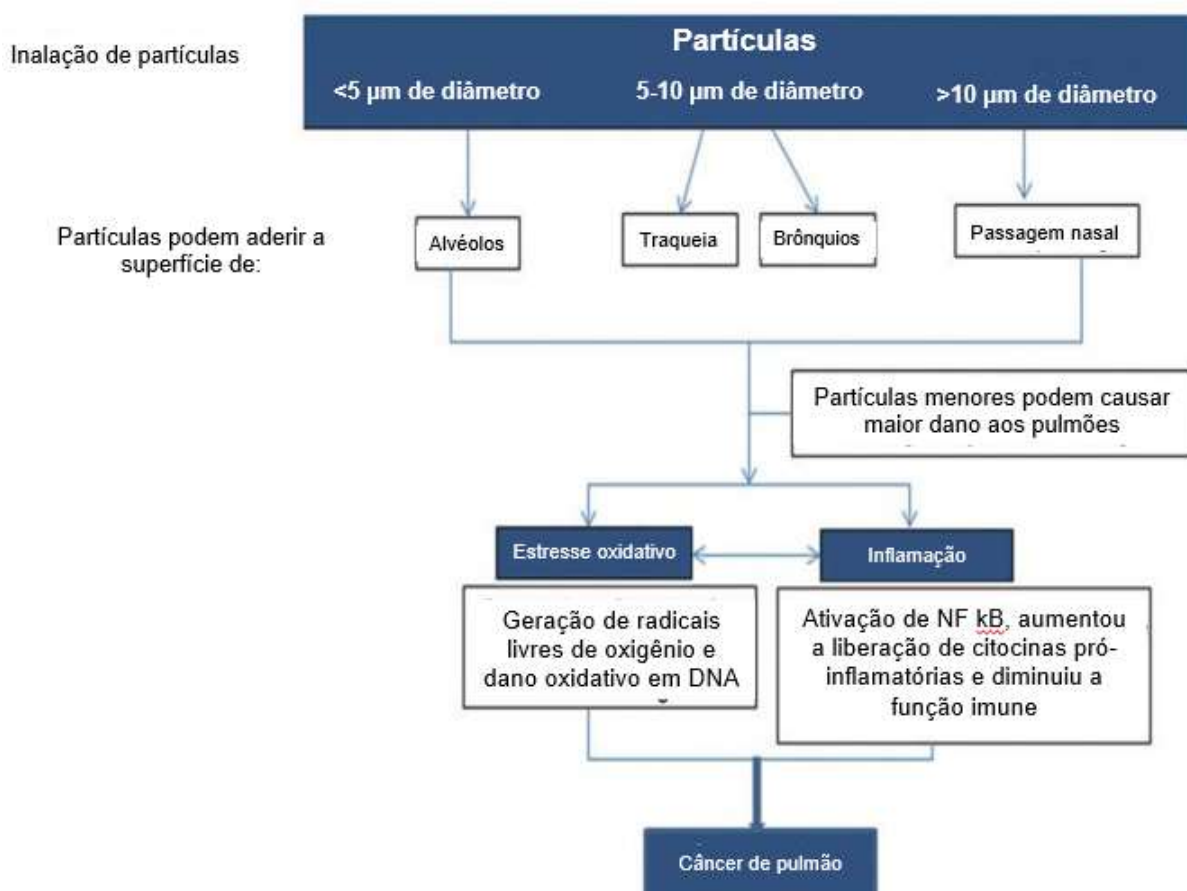


Figura 1 - Como o material particulado afeta os pulmões e pode levar ao câncer de pulmão. Extraído e traduzido de: Li e Gao 2014. Epidemiologic studies of particulate matter and lung cancer. Chin J Cancer.

Os efeitos adversos do MP são mais notados em crianças, idosos e em pessoas que sofrem de doenças respiratórias e cardiovasculares (Stojić et al., 2016). Nestas pessoas, há um agravamento do quadro de saúde por meio de infecções mais graves como bronquites, pneumonias, asma, câncer, podendo ainda levar à morte (CETESB, 2016).

As orientações da WHO de maio de 2016 indicam que, ao reduzir o material particulado (MP₁₀) de 70 µg/m³ para 20 µg/m³, as mortes relacionadas com a poluição do ar poderiam ser reduzidas em cerca de 15% (WHO, 2016). Segundo Hamra et al. (2014), a poluição do ar é uma mistura complexa que contém vários carcinógenos conhecidos e tem sido associada ao aumento do risco de câncer de pulmão em muitos estudos nos últimos 50 anos. Conforme American Cancer Society (2017), estima-se que 5% de todas as mortes por câncer de pulmão podem estar relacionadas à poluição do ar ambiente.

Em um estudo realizado por Araujo et al. (2008) para comparar os efeitos pró-aterogênicas de partículas ambientais de 0,18 μm (partículas ultrafinas) com partículas de 2.5 μm em camundongos, constataram que as extensões das lesões vasculares encontradas nos diferentes grupos de animais sugerem uma redução na capacidade anti-inflamatória do HDL induzida pelo material particulado. Identificaram ainda um aumento de 55% nas lesões ateroscleróticas em aortas quando comparado as partículas ultrafinas com o ar filtrado, e, um aumento de 25% quando comparado as partículas ultrafinas com as partículas finas, o que sugere que as partículas mais pequenas são mais pró-aterogênicas.

1.3 IMPLICAÇÕES DA INALAÇÃO DA FUMAÇA DA QUEIMA DE COMBUSTÍVEIS DURANTE A REALIZAÇÃO DE EXERCÍCIO FÍSICO

A prática regular de exercícios físicos tem sido reconhecida como um dos elementos indispensáveis para a promoção da saúde humana, reduzindo a mortalidade, o risco de doenças cardiovasculares, câncer e diabetes (Johnsen et al., 2013). Proporciona adaptações do sistema respiratório, aumento na taxa de ventilação e broncodilatação que ultrapassa o período de exercício (Scichilone et al., 2010). Entretanto, o ambiente em que essa prática se desenvolve pode comprometer os possíveis benefícios atribuídos ao exercício, uma vez que o exercício físico eleva o metabolismo celular e concomitantemente promove alterações na respiração que amplia a captação de ar inalado. Portanto, conforme Florian (2016) é de interesse científico e de saúde pública entender se os efeitos respiratórios do exercício físico são modificados quando é realizado em um ambiente urbano altamente poluído.

Segundo Giles e Koehle (2014), durante o exercício físico submáximo, a respiração muda de predominantemente de nasal para oral o que faz com que o sistema de filtração nasal passe a ser ignorada, aumentando potencialmente a dose de poluentes e promovendo efeitos nocivos à saúde. Carlisle e Sharp (2001) citam três razões pelas quais os atletas possuem risco especial ao inalar poluentes durante o exercício físico. Em primeiro, há um aumento proporcional na quantidade de poluentes inalados com o aumento da ventilação durante o exercício; em segundo, uma fração maior de ar é inalada pela boca durante o exercício, evitando eficazmente os mecanismos nasais normais para a filtração de partículas grandes e vapores

solúveis, e em terceiro, o aumento da velocidade do fluxo de ar transportado direciona os poluentes para os espaços mais profundos do trato respiratório.

O relatório do COMEAP (1995) reconhece que o exercício físico pode ter um efeito variável na deposição de partículas, dependendo do tamanho de partícula e padrão de respiração, porém, é possível que pelo aumento da velocidade de fluxo de ar, os poluentes não sejam depositados, mas, simplesmente exalados.

Carlisle e Sharp (2001) afirmam que exercícios extenuantes em ambientes próximos ao tráfego pesado por 30 minutos podem aumentar o nível de COHb até 10 vezes, o que é o equivalente a fumar 10 cigarros. Giles e Koehle (2014) afirmam que a hipóxia tecidual, induzida pela COHb pode ser detectada pelo sistema nervoso central e estimular os centros respiratórios a aumentar a ventilação (VE). Para os autores, após a administração de monóxido de carbono, a VE não parece ser afetada durante o exercício de baixa intensidade, porém, em exercícios de intensidade mais elevados (acima do limiar de lactato) a VE aumenta exponencialmente, e, quanto maior for o percentual de COHb, mais elevada a VE para a mesma taxa de trabalho. O aumento da VE e do percentual de COHb associada a exposição ao monóxido de carbono pode dar início a um ciclo vicioso que pode aumentar ainda mais a VE e o percentual de COHb. Para haver essas mudanças na VE, é necessário um aumento nos níveis de COHb entre 11% e 20%, o que equivale ao percentual de COHb dos fumantes e exigiria a exposição a concentrações de 120 ppm (Giles e Koehle, 2014).

Para Carlisle e Sharp (2001), com o aumento nos níveis de CO na corrente sanguínea, menos O₂ é liberado da hemoglobina para mioglobina, fazendo com que o coração eleve a frequência na tentativa de compensar a falta de oxigênio no músculo. Um estudo realizado por Schelegle e Adams (1986) com dez atletas de endurance altamente treinados que foram expostos de forma aleatória ao ar filtrado, e de 0,12, 0,18 e 0,24 ppm de O₃ durante a execução de um protocolo de simulação competitiva de uma hora em uma bicicleta ergométrica, constatou que todos os atletas completaram o protocolo, quando expostos ao ar filtrado, porém, três atletas que foram expostos ao O₃ não completaram o protocolo. Foi observado um aumento significativo na incapacidade de completar o protocolo de exercício com o aumento da exposição O₃ quando comparado com ar filtrado. Houve também um decréscimo significativo e progressivo da função pulmonar.

De acordo com Giles e Koehle (2014), os efeitos do O₃ na função pulmonar não são diferentes se a exposição ocorre por via oral em comparação com oral/nasal

ou por via nasal. No entanto, prejuízos na função pulmonar são significativamente maiores com o aumento no número de ventilações ao se exercitar comparados com ventilações normais. A dose de O₃ (concentração, VE, tempo) desempenha um papel importante na função do pulmão durante a prática de exercícios. Para Carlisle e Sharp (2001), a exposição elevada ao O₃ pode causar náuseas, dor de cabeça e anormalidades da função pulmonar, e, a gravidade dos sintomas geralmente são aceleradas pelo exercício físico.

Em um estudo realizado por Volpino et al. (2004) para avaliar o impacto da poluição atmosférica relacionada com o tráfego veicular na função respiratória e cardiovascular entre os policiais de trânsito em uma grande cidade italiana os pesquisadores constataram que a exposição crônica à poluição do tráfego pode reduzir a resistência ao esforço físico e aumentar o risco de alterações cardiovasculares e respiratórias.

Giles, Carlsten e Koehle (2012), realizaram um estudo com o objetivo de determinar o efeito na função pulmonar e cardiorrespiratória da exposição pré-exercício ao escape de diesel no desempenho em uma prova de ciclismo de 20 km. O estudo contou com a participação de oito homens treinados, expostos previamente a 60 minutos ao ar filtrado ou ao escape de diesel (concentração de 300 µg/m³ de MP 2,5) seguido de uma prova de tempo de ciclismo de 20 km. Constataram que uma exposição de 60 minutos ao escape de diesel antes do exercício atenuou significativamente a broncodilatação induzida pelo exercício e aumentou significativamente a frequência cardíaca durante o exercício. A exposição pré-exercício ao escape de diesel não prejudicou significativamente o tempo de ciclagem de 20 km.

Daigle et al. (2003), avaliaram a deposição total de partículas ultrafinas de carbono em 12 indivíduos saudáveis (6 do sexo feminino, 6 masculino) em repouso e após exercício, utilizando um sistema de exposição de bocal. Constataram que o diâmetro médio das partículas foi de 26 nm com desvio padrão de 1,6 e que a fração de deposição numérica aumentou à medida que o tamanho de partícula diminuiu. Não foram observadas diferenças entre os gêneros. Quando comparado repouso com exercício, o número total de partículas depositadas foi mais de 4,5 vezes maior durante o exercício devido ao aumento combinado da fração de deposição e ventilação minuto. A deposição fracionada de partículas ultrafinas durante a

respiração bucal é alta em indivíduos saudáveis e aumenta ainda mais com o exercício.

Vieira et al. (2012) realizaram um estudo com o objetivo de investigar os efeitos de 5 semanas de exercício aeróbico em associação com a exposição a partículas oriundas da combustão de motor a diesel, onde constataram que a instilação das partículas de diesel aumentou a liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e RNS) pulmonar, sugerindo que a exposição à poluição do ar pode levar a um aumento da produção de radicais livres. Identificaram ainda que, o exercício aeróbio inibe a inflamação pulmonar, liberação de citocinas pró-inflamatórias sistêmicas e os níveis pulmonares de estresse oxidativo e nitrosativo.

Florian (2016) realizou um estudo com objetivo de desencadear os efeitos agudos da poluição atmosférica relacionada ao trânsito e avaliar o impacto da pré-exposição ao exercício físico sobre os resultados respiratórios. Constatou que pessoas saudáveis após a realização de exercício físico, mesmo em ambientes altamente poluídos, experimentam um aumento agudo na função das vias aéreas respiratórias superiores que permanece significativo ao longo de várias horas. No entanto, os indivíduos, independentemente da realização de exercício físico, sofrem uma queda aguda na função das vias aéreas respiratórias superiores e inferiores após um aumento das concentrações de material particulado superior a 2,5 microm. Contudo, relatou que o exercício físico pode diminuir o impacto negativo imediato e retardado das altas concentrações de MP nas vias respiratórias.

Em um grande estudo de coorte dinamarquês com 52.061 participantes, (48%) homens e (52%) mulheres, com idade entre 50 e 64 anos, Andersen et al., (2015) examinaram se os benefícios da atividade física sobre a mortalidade são moderados pela exposição a longo prazo a altos níveis de poluição do ar em um ambiente urbano. Utilizaram informações sobre a exposição individual ao NO₂ relativa ao endereço dos participantes durante 35 anos. Constataram que a atividade física externa (ciclismo e jardinagem) em áreas com alta poluição do ar pode moderar, mas não reverter, os benefícios da atividade física na mortalidade respiratória: os efeitos adversos dos poluentes adicionais inalados ao longo do tempo não superam os benefícios da atividade física. Segundo Florian (2016), muitos estudos epidemiológicos avaliaram os efeitos respiratórios agudos dos poluentes do ar apenas em subpopulações suscetíveis, contudo, questiona se os resultados desses estudos podem ser transferidos para indivíduos saudáveis.

Um estudo para examinar se o exercício habitual modificaria os efeitos da poluição do ar sobre a mortalidade Wong et al. (2007), encontraram efeitos significativos da poluição do ar ambiente (NO_2 , MP_{10} e O_3) sobre a mortalidade de indivíduos da cidade de Hong Kong que não realizavam exercício. Os resultados deste estudo fornecem evidências de que o exercício habitual pode prevenir morte prematura atribuível à poluição do ar.

Matt et al. (2016) realizaram um estudo com indivíduos adultos saudáveis e constataram que após realizar exercício físico mesmo em ambientes altamente poluídos, há um aumento agudo na função das vias aéreas respiratórias superiores o qual permanece significativo ao longo de várias horas após a realização do exercício. Observaram ainda que independentemente da realização de exercício físico há uma queda aguda na função das vias respiratórias superiores e inferiores depois do aumento das concentrações de partículas de $\text{MP}_{2,5}$, MP_{10} . No entanto, relatam que o exercício físico poderia diminuir o impacto negativo imediato e retardado de altas concentrações de material particulado nas vias aéreas respiratórias e sugerem que o aumento do fluxo das vias aéreas durante o exercício físico conduz a deposição por meio de impactação na região nasofaríngea, não sendo capaz de interferir com os efeitos do exercício físico nas vias aéreas superiores e inferiores.

Vários mecanismos para explicar a relação entre exercício e inflamação das vias aéreas têm sido explorados em modelo animal. Por exemplo, camundongos exercitados demonstraram ter expressão reduzida de citocinas pró-inflamatórias T helper (Th)-2, redução da ativação do fator de transcrição inflamatória NF-kB (Pastva et al. 2004) e mudanças epigenéticas que podem ocorrer em resposta ao exercício físico podem levar a uma redução da inflamação (Horsburgh et al. 2015).

Além disso há evidências crescentes de que quaisquer efeitos prejudiciais respiratórios da exposição aguda ao escape de diesel são atribuíveis mais ao seu conteúdo particulado, em particular, as pequenas partículas (UFP) em detrimento das maiores ($\text{MP}_{2,5}$ – MP_{10}) (Abe et al., 2000; Penttinen et al., 2001; Li et al., 2003; WHO, 2005; Chiu e Yang, 2009; Cheng et al., 2014; Costa et al., 2014). Além das partículas grossas (2,5 a 10 μm de diâmetro), a exaustão do diesel contém em números muito maiores, a UFP (<0,1 μm de diâmetro). Está bem documentado que a inalação de poluentes do ar causa danos oxidativos e inflamação no sistema respiratório, resultando em obstrução das vias aéreas e redução do volume expiratório forçado (FEV) (Rundell, 2012; McKenzie, 2012).

Em um estudo experimental para investigar as interações entre os efeitos de curto prazo da poluição do ar e o exercício físico na função pulmonar Kubesch et al. (2015), constataram que o exercício físico em indivíduos saudáveis aumenta o volume expiratório forçado, capacidade vital forçada (CVF) e o fluxo expiratório forçado (FEF) mostrando que os benefícios do exercício físico superam os riscos relacionados à exposição à poluição do ar. Essa descoberta é consistente com outros estudos que investigam os efeitos da poluição do ar sobre a saúde combinados com curtos períodos de exercício físico (Strak et al., 2010; Giles, Carlsten e Koehle 2012; Weichenthal et al., 2012; Jarjour et al., 2013).

Segundo Tainio et al. (2016), o ciclismo e caminhada devem ser promovidos na maioria dos ambientes, sendo contraindicado apenas em um pequeno número de cidades do mundo, onde o exercício ao ar livre pode levar a um aumento do risco a saúde devido ao elevado nível de PM_{2,5}.

1.4 EFEITOS INFLAMATÓRIOS E OXIDATIVOS DA INALAÇÃO DE DEP

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são encontradas em todos os sistemas biológicos e têm origem no metabolismo do oxigênio molecular. O oxigênio sofre redução univalente ou bivalente, com respectiva produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio e que, dependendo do estado redox, produz a forma mais reativa e deletéria às biomoléculas, o radical hidroxila (Halliwell e Gutteridge, 1989).

ERO são radicais livres gerados fisiologicamente durante a fosforilação oxidativa, desempenhando vários papéis fisiológicos, e são removidos rapidamente do corpo, sendo que, sua persistência pode causar disfunção e morte celular (Rahman, Biswas e Kode, 2006). Segundo Halliwell e Gutteridge (1989), radicais livres de oxigênio são moléculas ou fragmentos moleculares reativos que contêm um elétron não pareado em seu orbital mais externo. Tendem a extrair elétrons de outras moléculas para alcançar um estado quimicamente mais estável.

Nas células não fagocíticas, as mitocôndrias são a principal fonte de ERO, mas o retículo endoplasmático liso e os microssomas também podem produzir radicais livres (Halliwell, 1991). Níveis fisiológicos moderados de ERO são importantes para modular funções celulares como apoptose, expressão gênica, transdução de sinal e defesa contra patógenos. (Halliwell e Gutteridge, 1989).

Um desequilíbrio entre a geração de ERO e defesas antioxidantes leva a uma condição negativa conhecida como estresse oxidativo no qual antioxidantes celulares são insuficientes para manter ERO abaixo de um limiar tóxico devido à produção excessiva de ERO e/ou perda de defesas antioxidantes celulares (Kinnula et al., 2005).

As principais espécies reativas de oxigênio são os radicais livres, ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila ($HO^{\cdot-}$), e algumas espécies não-radicaais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mensageiro secundário na transdução de sinal intra e extra-celular; o ácido hipocloroso (HOCl), agente oxidante produzido por neutrófilos e o oxigênio singlete (1O_2), uma forma altamente reativa do oxigênio (Barreiros e David, 2006).

Mecanismos de defesa contra oxidantes envolvem sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. As principais enzimas antioxidantes incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), que são ativadas normalmente durante o metabolismo celular, porém, suas atividades podem aumentar em função da presença de ROS. A SOD está presente na matriz mitocondrial (Mn-SOD), no citosol (CuZn-SOD) e no meio extracelular (Rahman, Biswas e Kode, 2006). Constitui a primeira linha de defesa enzimática contra a produção intracelular de radicais livres, catalisando a dismutação do ânion superóxido para peróxido de hidrogênio que é então convertido em água pela catalase e glutathione peroxidase (Hollander et al., 2000). A catalase é uma proteína de 240 kDa que exerce sua função antioxidante reduzindo peróxido de hidrogênio produzido pela SOD (Rahman, Biswas e Kode, 2006). Na reação são formados dois produtos, oxigênio molecular e água (Chance et al., 1979). Esta proteína está localizada, principalmente, no peroxissoma, entretanto, outras organelas como as mitocôndrias podem conter atividade da CAT. No pulmão, é encontrada principalmente em macrófagos, pneumócitos e fibroblastos pulmonares (Rahman, Biswas e Kode, 2006).

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos para água e álcool, usando a glutathione como doador de elétrons. A GPx está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial (Miyamoto et al., 2003). No tecido pulmonar normal, é produzida principalmente pelas células epiteliais brônquicas e macrófagos alveolares. Sua principal função é proteger as células epiteliais alveolares contra o estresse oxidativo, como o dano pulmonar induzido por hiperóxia (Rahman, Biswas e Kode, 2006).

O sistema de defesa antioxidante não enzimático é constituído por antioxidantes hidrossolúveis que incluem glutathione, ácido ascórbico, ácido úrico e antioxidantes lipossolúveis que incluem alfa-tocoferol, ubiquinóis e carotenóides. Proteínas extracelulares ligantes de ferro e cobre (como a albumina, transferrina, lactoferrina, ferritina, haptoglobina e ceruloplasmina) também exercem efeitos antioxidantes por inibir as reações de Fenton e Haber Weiss (Barreiros e David, 2006).

O estresse oxidativo também é responsável pela estimulação de várias vias de sinalização celular, o que pode resultar na adaptação das células levando a uma melhor resistência ao estresse. Relacionado a isso, os efeitos do exercício físico regular no estado oxidante/antioxidante têm sido estudado, e uma regulação positiva dos mecanismos relacionados pela elevação dos fatores transcricionais de várias enzimas antioxidantes foi encontrada em alguns tecidos (Radak et al., 2001; Siu et al., 2011).

O estresse causado pelo exercício físico regular pode ser responsável por diversas modificações locais e sistêmicas que levam à adaptação do organismo. Duas hipóteses principais podem ser consideradas para explicar esta afirmação: uma diminuição na produção de ERO e/ou um aumento na proteção antioxidante (Soares et al., 2015). O aumento do estado de estresse oxidativo induzido pelo exercício físico pode variar de acordo com as características do exercício, como intensidade, tempo e frequência (Fisher e Bloomer 2009).

Os benefícios relacionados à saúde do exercício físico regular são amplamente descritos na literatura. Alguns dos principais mecanismos estão relacionados à prevenção de danos ao DNA envolvidos em diversas doenças generativas e no processo de envelhecimento (Soares et al., 2015). Embora diferentes perspectivas e mecanismos tenham sido propostos para explicar a ocorrência de mutações no DNA, é possível que o estresse oxidativo desempenhe um papel importante no dano ao DNA relacionado ao exercício (Mergener et al., 2009). É amplamente descrito que o exercício crônico reduz o estresse e os danos oxidativos, tanto pela diminuição da produção de ERO como pelo aumento da capacidade antioxidante, além de melhorar a eficiência das mitocôndrias em vários órgãos e sistemas (Ascensao et al. 2003).

Segundo Soares et al. (2015), a diminuição do dano oxidativo associado ao treinamento físico pode ser explicada por um aumento na eficiência antioxidante e metabólica, o que possivelmente evita a estimulação da atividade enzimática do

reparo do DNA. Isto posto, postula-se que o exercício possa diminuir o dano em DNA, reduzindo o risco de desenvolvimento de mutações celulares associadas a várias doenças (Mota et al. 2010). Contudo, a prática de exercício físico em ambientes poluídos leva a exposição a DEP, que pode causar efeitos adversos graves à saúde, como doenças respiratórias crônicas e cardiopulmonares (Wong et al., 2007; Cheng et al., 2014; Costa et al., 2014; Florian, 2016; Matt et al., 2016).

Segundo Ovreik et al. (2017), em termos gerais, os efeitos da exposição a partículas podem ser divididos naqueles atribuídos diretamente aos efeitos do núcleo das partículas ou seus componentes, e os mais indiretamente causados pela formação de espécies reativas, como ERO. No primeiro caso as partículas podem desencadear efeitos através de reações diretas entre a superfície reativa ou componentes solúveis aderidos e biomoléculas, e no segundo caso as ERO podem ser geradas através de reações entre superfícies de partículas e meios aquosos, constituintes orgânicos solúveis como PAHs, quinonas que podem formar ERO e metabólitos eletrofílicos reativos através de ciclo redox e ativação metabólica, e metais de transição reativos a Fenton que podem contribuir para a formação de reativos como radical hidroxila (HO^\bullet).

Segundo Li et al. (2003), o complexo papel das ERO nas respostas biológicas à exposição a DEP está provavelmente ligado tanto ao nível de resposta quanto ao local de formação. As células respondem a baixos níveis de estresse oxidativo, aumentando os níveis de antioxidantes e restaurando a homeostase redox celular, em parte por meio da ativação da via Nrf2/ARE, sensível à ERO. Em níveis intermediários, o estresse oxidativo leva à ativação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e à modulação da atividade dos fatores de transcrição pró-inflamatórios centrais, como fator nuclear- κB (NF- κB) e proteína ativadora-1 (AP-1) que estão ligados à produção e liberação de várias citocinas e quimiocinas (Li et al., 2003; Ovreik et al., 2015; Kelly e Fussell 2015). Em níveis elevados de estresse oxidativo, frequentemente resulta em morte celular, que na maioria das vezes pode originar necrose devido à inativação de grupos tiol essenciais para a atividade da caspase, combinada com o esgotamento de energia necessária para o processo apoptótico. Na situação *in vivo*, a morte celular necrótica resultará na liberação de padrões moleculares associados a dano (DAMP), representando fortes sinais pró-inflamatórios (Rock e Kono, 2008).

Ovrevik et al. (2017), destacam ainda que antioxidantes poderiam atenuar várias respostas induzidas por partículas, incluindo a ativação de proteínas quinases e fatores de transcrição envolvidos na regulação de genes pró-inflamatórios. Os autores destacam que DEP e outras partículas que transportam substâncias químicas orgânicas podem aumentar o nível de ERO como consequência do ciclo redox de metabólitos, como espécies de semiquinona formadas após exposição celular a PAHs ou derivados de PAH. Da mesma forma, a presença de metais de transição, como ferro e cobre, pode sofrer ciclos redox (reações de Fenton ou Haber-Weiss) e contribuir para a geração de ERO. Além disso, os autores destacam que os processos redox são também uma parte essencial dos processos fisiológicos e, como tal, são rigorosamente regulados. A oxidação reversível dos resíduos de cisteína por H_2O_2 inativa as proteínas tirosina fosfatases, permitindo a ativação da quinase. Este é um mecanismo principal de sinalização redox e parece particularmente importante na ativação de receptores de tirosina quinases na membrana plasmática (Petry, Weitnauer e Gorch, 2010). Está bem documentado que muitos dos genes pró-inflamatórios, incluindo IL-1 α/β , TNF- α , CXCL8 (IL-8), IL-6 e COX-2, são pelo menos parcialmente regulados por processos redox endógenos (Ovrevik et al., 2017).

Ovrevik et al. (2017) propõem um mecanismo para o efeito pró-inflamatório oriundo de DEP (Figura 2). Segundo os autores, o DEP pode induzir dano epitelial ou estresse oxidativo, levando à ativação da inflamação com recrutamento de neutrófilos e outras células imunológicas. A exposição prolongada pode levar a um estado crônico de inflamação. Células imunes ativadas liberam oxidantes endógenos que causam estresse oxidativo, que subsequentemente podem levar a danos no DNA. Células de tecido danificadas e células imunes ativadas também liberam uma série de fatores de crescimento e mediadores inflamatórios que contribuem para a sobrevivência e crescimento tumoral, angiogênese e metástase.

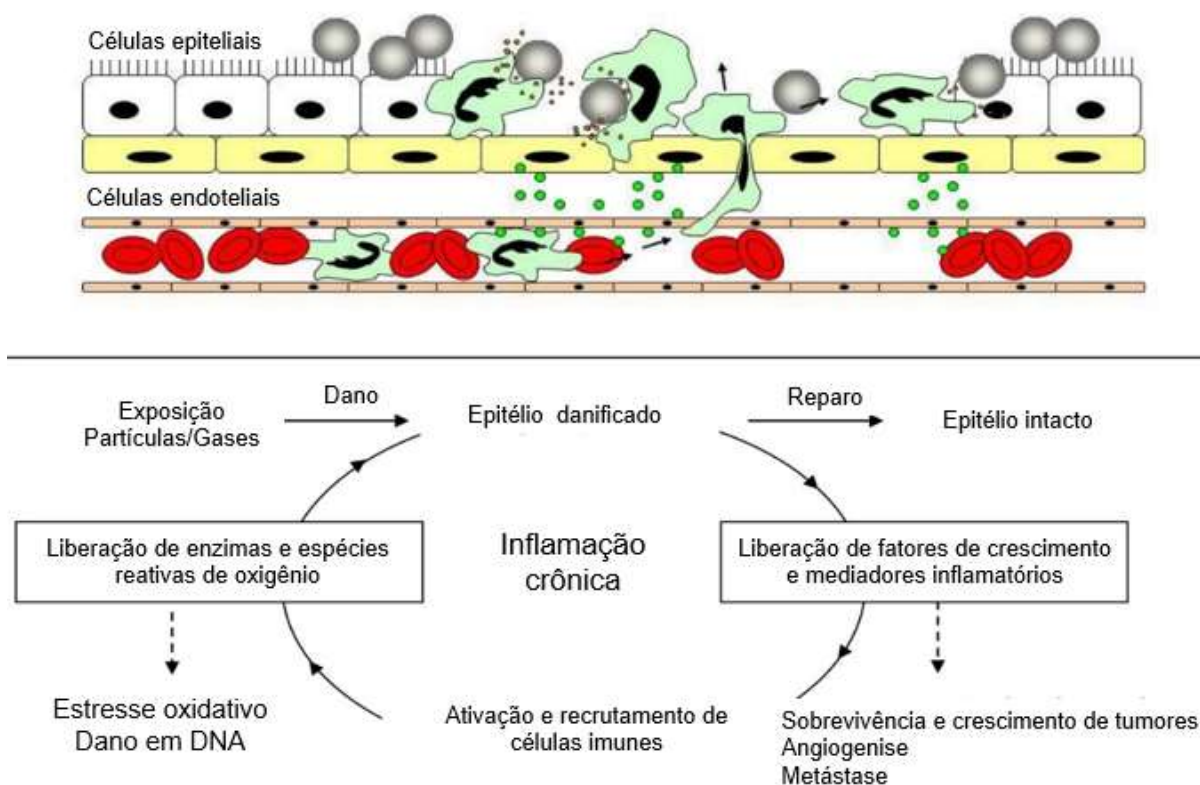


Figura 2 - Mecanismo proposto para efeito pró-inflamatório derivado de DEP. Extraído e traduzido de Ovreik et al. 2017.

1.5 JUSTIFICATIVA

O exercício aeróbico regular promove uma série de alterações fisiológicas que se correlacionam com a diminuição da morbidade e aumento da longevidade. Muitos programas de exercícios se desenvolvem em áreas ao ar livre, que em ambientes urbanos pode estar perto de rodovias, em estreita proximidade com os veículos a motor. A emissão de gases por veículos automotores são o maior contribuinte individual para a poluição do ar urbano, e seus componentes tóxicos contribuem para doenças respiratórias e câncer. Muitos dos efeitos da poluição atmosférica sobre a saúde humana têm sido estudados, porém, não há consenso sobre suas implicações durante o exercício físico e no desempenho dos atletas no esporte. Há necessidade de compreender os efeitos da exposição em longo prazo, os níveis de concentração de poluentes do ar que interferem no desempenho e identificar as alterações

fisiológicas que ocorrem durante o exercício de resistência aeróbia. Tendo como base esses pressupostos, percebeu-se a necessidade de compreender os efeitos bioquímicos e moleculares no tecido pulmonar induzidos pela prática regular e de longo prazo do exercício em ambientes que apresentem níveis elevados de poluentes. Nesse sentido, postulava-se que pessoas que realizam exercício físico regular ao ar livre nessas condições estavam mais susceptíveis aos efeitos negativos e nocivos da poluição comprometendo os efeitos positivos do próprio exercício.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral: verificar as alterações bioquímicas e moleculares induzidas pelo material particulado proveniente da combustão de motor a diesel DEP em pulmão de camundongos expostos a um programa de treinamento físico.

2.2 objetivos específicos:

- Comparar os efeitos da exposição ao material particulado proveniente da combustão de motor a diesel sobre parâmetros histopatológicos do pulmão em camundongos praticantes e não praticantes de exercício físico;
- Comparar os efeitos da exposição ao material particulado proveniente da combustão de motor a diesel sobre parâmetros de estresse oxidativo pulmonar em camundongos praticantes e não praticantes de exercício físico;
- Comparar os efeitos da exposição ao material particulado proveniente da combustão de motor a diesel sobre parâmetros inflamatórios pulmonares em camundongos praticantes e não praticantes de exercício físico;
- Avaliar os efeitos da exposição ao material particulado proveniente da combustão de motor a diesel sobre parâmetros de genotoxicidade em sangue e pulmão em camundongos praticantes e não praticantes de exercício físico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

A presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 09/08/2016, protocolo no 002/2016-2, e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Anexo A).

3.2 PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DO POLUENTE

Com o objetivo de mimetizar a realização de exercício físico em áreas poluídas, foi construído uma caixa para inalação de poluentes a qual foi ligada a um motogerador de combustão a diesel Toyama TD 7000 CXE, equipado com motor 10 HP, série FA, bicilíndrico, 4 tempos, injeção direta de combustível, refrigerado a ar com 418 cilindradas cm^3 e rotação nominal de 3.000 a 3.600 RPM (Figura 3). O combustível utilizado para o motor foi o diesel B S 500: combustível com teor de enxofre, máximo, de 500 mg/kg ou 500 ppm.

A fumaça proveniente da queima do combustível foi canalizada em uma mangueira plástica de poliuretano com 30mm de diâmetro por uma distância de 40 metros desde a saída do motor até entrada da caixa hermética.

A transferência da fumaça para a caixa hermética ocorreu com o motor em funcionamento em baixa rotação, direcionando o fluxo do poluente diretamente para o interior caixa hermética.



Figura 3- Motor Toyama TD 7000 CXE em seu local de funcionamento

Para a submeter os animais a exposição a fumaça, foi construída uma caixa hermética com 170 cm de comprimento, 65 cm de largura e 65 cm de altura, totalizando 718,2 litros (Figura 4). A caixa foi conectada ao motor Toyama TD 7000 CXE pela mangueira previamente descrita. Após a ignição do motor, a fumaça proveniente da queima do combustível foi direcionada para o interior da caixa onde era dispersada por um sistema difusor composto por dois canos de 40 mm fixados nas laterais da caixa hermética e perfurados a cada 10 cm para possibilitar uma distribuição homogênea da fumaça no interior da caixa hermética.

No fundo da caixa foram instaladas 06 (seis) ventoinhas de 5x5 cm da marca Berflo modelo AD1212UB-A73GL com a finalidade manter as partículas em suspensão. Também foi instalado no duto coletor do sistema de exaustão uma Ventoinha de 20x20 cm da mesma marca e modelo com a finalidade de retornar as partículas que permaneciam em suspensão ao sistema difusor, fazendo com que os mesmos permaneçam em circulação.



Figura 4 - Caixa para inalação de poluentes

Durante toda a exposição a entrada de fumaça se manteve constante controlada por uma válvula de gaveta possibilitando que os níveis de material particulado se mantivessem relativamente estáveis nas concentrações definidas para a realização do estudo, $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $1.000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e $2.000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ conforme se pode constatar nos apêndices A, B e C.

As concentrações de material particulado foram medidas pelo monitor de partícula DustTrack DRX, Modelo 8533 (Figura 5) que afere as concentrações de aerossóis correspondente MP₁, MP_{2,5}, MP₄, e MP₁₀. O equipamento foi posicionado no interior da caixa hermética no mesmo nível onde se encontravam os animais em exposição.



Figura 5- Posição do monitor DustTrack DRX no interior da caixa para inalação de poluentes

As concentrações de monóxido de carbono foram medidas pelo analisador de gases de combustão Sonda de até 500°C Testo 310 (Figura 6). O equipamento analisa as concentrações de monóxido de carbono de 0 (zero) a 4.000 (quatro mil) ppm. O sistema de exaustão permaneceu ligado durante toda a exposição e, em nenhum momento das três diferentes concentrações, o monóxido de carbono excedeu a 03 partes por milhão.

Para a análise, foi introduzida uma sonda de 40 cm de comprimento na tampa superior da caixa hermética distante 05 cm do painel de controle e 35 cm da lateral da caixa. Optou-se por este posicionamento da sonda, porque em testes previamente realizados em um protótipo de madeira não foram constatadas diferenças nas concentrações de CO com a sonda posicionada 05, 80 e 130 cm de distância do painel de controle.

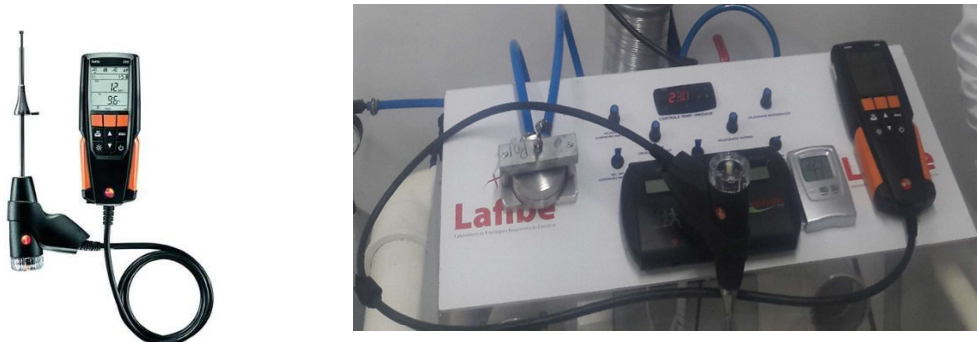


Figura 6 - Analisador de gases de combustão Sonda de até 500°C Testo 310

O material particulado em suspensão também foi coletado por um filtro de papel da marca Whatman 55 mm e encaminhado para análise da composição química dos elementos (Figura 7).



Figura 7 – Filtro para coleta de material particulado

Durante toda a exposição a fumaça, a temperatura no interior da caixa esteve entre 21° C e 23° C controlada pelo sistema COEL modelo TZ11 digital (Figura 8).



Figura 8 – Controlador de temperatura COEL TZ11 digital

A umidade no interior da caixa hermética foi medida pelo termo higrômetro da marca incoterm modelo 7666.02.0.00 (Figura 9).



Figura 9 – Termo higrômetro da marca incoterm modelo 7666.02.0.00.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

A abordagem aqui empregada foi inovadora e, portanto, não havendo consenso na literatura de uma concentração de material particulado que promovesse significativos níveis de toxicidade nos animais experimentais durante um período de exposição crônica.

De acordo com WHO (2005), concentrações acima de $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$ e $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de MP_{10} durante 8 horas diárias de exposição, são consideradas nocivos à saúde humana, entretanto, em animais experimentais, ainda não há concentrações estabelecidas que se relacionem àquelas observadas em humanos.

Desta forma, 63 camundongos da linhagem swiss (60 dias de idade, cerca de 30-35g), fornecidos pelo Biotério da UNESC foram expostos a fumaça coletada durante uma hora diária por 08 semanas, divididos randomicamente em 07 grupos experimentais ($n=9$) sendo um grupo de controle exposto ao ar ambiente não praticante de exercício, 03 grupos expostos ao ar poluído com as seguintes concentrações de MP $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $1.000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e $2.000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de DEP e mais três grupos expostos as mesmas concentrações MP praticantes de exercício (Figura 10). O material particulado utilizado no estudo é oriundo de partículas de escape de diesel DEP caracterizados na literatura e compostas basicamente por metais pesados tóxicos, como Cr, As, Cd e Pb, além de outros componentes iônicos (Park et al., 2011).

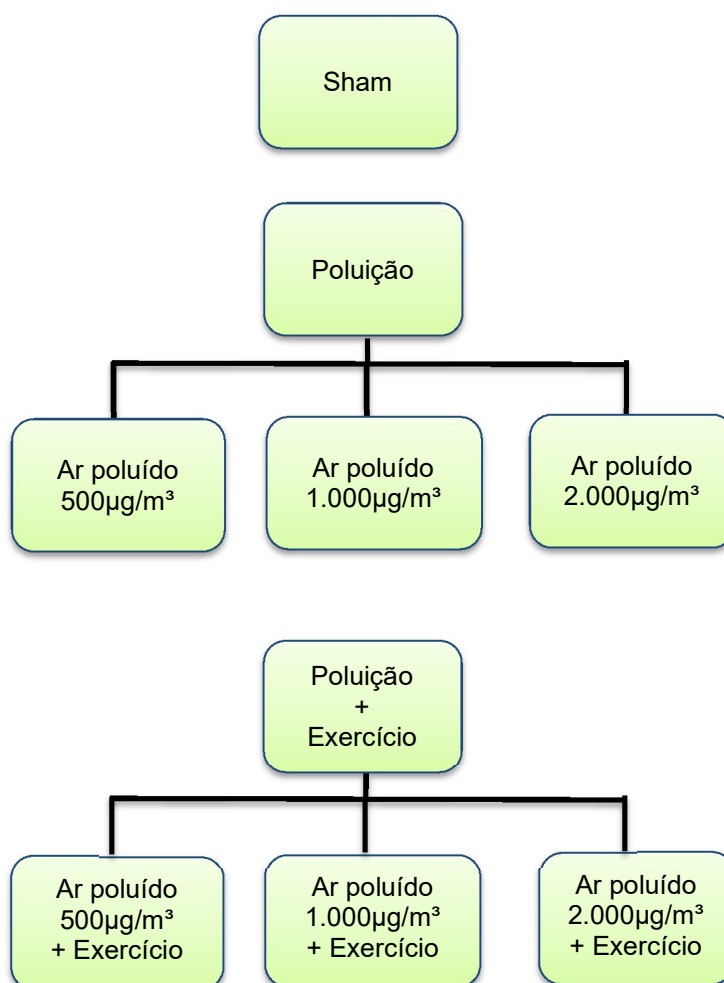


Figura 10- Composição dos grupos de estudo

3.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO

Os animais do grupo de exercício realizaram cinco sessões semanais de treinamento de corrida na esteira com a velocidade de 0,8 Km/h nas quatro primeiras semanas e 1,2 Km/h nas quatro semanas seguintes com duração de 60 minutos diários durante oito semanas, sobre o efeito da fumaça conforme explicado anteriormente no protocolo de preparação do poluente e na distribuição dos grupos. Para o treinamento de esteira os animais foram adaptados previamente durante uma semana com treinamento diário e duração de 10 minutos, na velocidade de 0.6 km/h, sem inclinação, para reduzir o estresse do ambiente. Os animais não receberam nenhum estímulo para correr. Foi utilizado o protocolo de treinamento aeróbico publicado por Souza et al., (2017).

Os animais foram agrupados em gaiolas com acesso livre à água e comida com temperatura ambiente de 23° C graus e ciclo de claro e escuro de 12 h, mantendo as condições sanitárias livre de patógenos específicos, com exaustão do ar. A dieta foi realizada com ração comercial padrão para roedores (DP-carboidrato: 70%; proteína: 20%; gordura 10%, totalizando 3,8 kcal/g). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei n° 11.794/08 (DOU 196, seção 1, outubro/2008).

3.5 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Após 48 horas da última exposição ao protocolo de inalação de fumaça de combustão de motor a diesel e da sessão de exercícios, foi feita a coleta de sangue pela cauda, de todos os animais para avaliação de índice e frequência de dano em DNA e posteriormente foram submetidos à eutanásia. Seis animais foram mortos por guilhotina para coleta de sangue e posterior contagem total de células. O sangue foi coletado e colocado em microtubos heparinizados e refrigerados.

Três animais foram mortos por deslocamento cervical para serem submetidos ao procedimento de lavado-broncoalveolar (LBA). Para tanto, a traqueia foi exposta cirurgicamente e injetado 1 ml de soro fisiológico com seringa apropriada para lavar o pulmão. Imediatamente após a injeção o fluido foi aspirado e armazenado em gelo para contagem total de células (câmara de Neubauer) e demais análises. O procedimento e aspiração do fluido foi realizado 3 vezes, com velocidade constante para impedir a lesão de estruturas.

Após o procedimento de LBA, o pulmão foi retirado por dissecação e preparado para as análises. As amostras foram imediatamente processadas e armazenadas a -80°C para análises bioquímicas. Os pulmões de 3 animais em cada grupo foram submersos em solução de paraformaldeído 4% para posterior processamento histológico.

O descarte dos animais foi feito em saco branco leitoso e armazenados em freezer -40°C para posterior tratamento e deposição final em aterro sanitário, conforme procedimentos estabelecidos pela Vigilância Sanitária (RDC 306/2004).

3.6 MÉTODO HISTOLÓGICO

Cortes longitudinais de tecido pulmonar foram removidos e imersos em solução fixadora de paraformaldeído 10% (PFA) tamponado por 48 horas para posterior processamento histológico. O material foi incluído em parafina e cortado em micrótomo obtendo-se cortes de 5 μm de espessura. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) para posterior aquisição das imagens e análise histológica da histoarquitetura do parênquima pulmonar.

Para análise histológica foram coletadas amostras de pulmão de cada animal, que foram embebidos em solução fixadora de paraformaldeído tamponado a 10% por 48 horas para posterior processamento e corte de lâminas histológicas com 4-5 μm de espessura. As lâminas foram coradas em HE e picro sirius (quantificação de colágeno), para posterior avaliação em microscopia de luz, utilizando o sistema de captura em microscópio invertido NIKON ECLIPSE Ti-U. Foi realizada a quantificação da área da fibra e a quantificação do núcleo central como análise de dano muscular, ambas análises foram realizadas por morfometria e estereologia (Valença et al., 2006).

3.7 ENSAIOS MOLECULARES E BIOQUÍMICOS

3.7.1 Determinação de proteínas

Alíquotas de homogeneizados pulmonares foram utilizadas. O teor de proteína foi determinado usando albumina bovina do soro como padrão (Lowry et al., 1951). O conteúdo total de proteína foi mensurado utilizando o reagente folinfeol (reagente fosfomolibdico-fosfotúngstico) adicionado para ligar a proteína. O reagente ligado foi lentamente reduzido e alterado de amarelo para azul. A absorbância de 750 nm foi utilizada.

3.7.2 Avaliação das espécies reativas de oxigênio

3.7.2.1 Diclorohidrofluoresceína (DCFH)

A produção intracelular de ERO foi avaliada utilizando o diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (LeBel, 1990). O DCFH (subproduto) é uma técnica bastante utilizada como meio de detecção da produção de radicais livres totais. A oxidação do 2'7'diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) pelas células causa a fluorescência da difluoresceína que pode facilmente ser lida em fluorímetro. Neste ensaio, 100 µL de água e 75 µL de DCFH-DA foram adicionadas a 25 µL de homogeneizado de amostra, homogeneizados em vórtex e levados ao banho-maria 37°C ao abrigo da luz por um período de 30 minutos. Separadamente, foi preparada a curva de calibração onde foi utilizado como padrão o DCFH-DA 0,1 µM diluído em tampão fosfato/EDTA em pH 7,4 em diferentes concentrações. As amostras e a curva de calibração foram processadas em duplicata e ao abrigo da luz. Ao final dos trinta minutos foram feitas as leituras no fluorímetro (525 nm excitação e 488 nm de emissão). Os resultados foram expressos em nmol de DCF por mg de proteínas (LeBel, 1990).

3.7.3 Marcadores de danos oxidativos

3.7.3.1 Malondialdeído (MDA)

Para avaliar os níveis de MDA, foi utilizado o protocolo segundo Grotto et al. (2007), onde as amostras de pulmão foram homogeneizadas em tampão Fosfato de Sódio com KCl, sendo logo após centrifugadas à 1.500 giros por 10 minutos, com refrigeração de 4°C. Do sobrenadante foram retirados 75 µL e adicionado mais 25 µL de água e 25 µL de NaOH 3N e incubado a 60°C por 30 minutos em banho Maria com a água em movimento. Logo após, foi adicionado 125 µL de H₃PO₄ 6% e 125 µL de TBA 0,8% e colocado novamente em banho Maria com a temperatura em 90°C por 45 minutos. Após esse tempo foi adicionado 50 µL de SDS 10% e mais 300 µL de n-butanol, levando-as ao vórtex por 1 minuto. Em seguida foram centrifugadas á 3000 g por 10 minutos. Destes sobrenadantes foram retirados 20 µL e injetados no HPLC.

3.7.4 Marcadores das defesas antioxidantes

3.7.4.1 Superóxido dismutase (SOD)

A SOD foi medida pela inibição da oxidação da adrenalina adaptado de Bannister e Calabrese (1987). As amostras de pulmão foram homogeneizadas em tampão de glicina. Os volumes de 5, 10 e 15 μ L foram retirados da mesma, a qual 5 ml de catalase (0,0024 mg/ml de água destilada), tampão de glicina 175-185 mL (0,75g em 200 ml de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5 μ L adrenalina (60 mM em água destilada +15 mL/ml de HCl fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 180s em intervalos de 10s e medido em leitor de ELISA a 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

3.7.4.2 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada com base na taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) presente na amostra, utilizando uma solução de H_2O_2 a 10mM em tampão de fosfato de potássio (50 mM), pH 7,0. Dois mililitros da solução de H_2O_2 e 20 mL foram colocadas numa cuvette de quartzo. Após a homogeneização, a taxa de decomposição de H_2O_2 máxima foi medida em um espectrofotômetro a 240 nm e os valores foram expressos como unidades de catalase/mg de proteína. Este protocolo segue a metodologia descrita por Aebi (1984) com adaptações.

3.7.4.3 Dosagem de GSH/GSSG

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurado após precipitação de proteína com 1 mL de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e DTNB 500 μ M. O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o DTNB e tióis atingiu um máximo em 5 minutos e manteve-se estável durante mais de 30 min. A absorbância foi lida a 412 nm depois de 10 min. Uma curva

padrão de glutathiona reduzida foi usado para calcular os níveis de GSH nas amostras. A GSSG foi mensurada a partir da reciclagem da GSSG redutase com monitoramento NADPH espectrofotometricamente na presença de 2-vinilpyridina. A concentração de GSH total e GSSG foram determinadas usando uma curva de regressão gerada a partir de vários padrões de GSH (Rahman et al., 2006).

3.7.5 Marcadores inflamatórios

3.7.5.1 Dosagens de Citocinas

As dosagens das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram realizadas no pulmão por meio do método de ELISA, segundo as especificações do fabricante (ThermoFisher Scientific). Uma placa de 96 poços, foi primeiramente recoberta com 100 μ L de solução contendo anticorpo de captura anti-TNF- α , anti-IL-1 β ou anti-IL-6, diluídos em tampão Coating Buffer (bicarbonato de sódio, carbonato de sódio e água deionizada). As placas foram incubadas overnight, na geladeira. Após sucessivas lavagens com 300 μ L de Wash buffer (PBS e Tween 20 (0,05%)), foi adicionado 200 μ L de Assay diluent (PBS contendo 1% de albumina) para o bloqueio, e a placa foi incubada por 1 hora, à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com 100 μ L de amostras pulmão e sua curvas padrão. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos de detecção anti-TNF- α , anti-IL-1 β ou anti-IL-6 durante 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e incubadas com avidina diluída 1:1000 em Assay diluente durante 30 minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e reveladas com TMB substrate solution (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA). A reação foi interrompida por adição de H₂SO₄ 2N. A leitura da absorbância foi realizada em 450 nm.

3.7.5.2 Contagem de células em câmara de Neubauer

Este protocolo consta da contagem total de leucócitos utilizando a câmara de Neubauer. As células nucleadas foram contadas nos quatro quadrantes externos da câmara de Neubauer, cujo volume total é de 0,4 mm³. Amostras com elevada

celularidade, pode-se realizar uma diluição em solução aquosa de fucsina 0,2% na proporção (1:20). Essa solução otimiza a contagem, sobretudo por corar o núcleo das células nucleadas e por provocar lise dos eritrócitos, os quais, dependendo da quantidade, dificultam a contagem (Comar et al., 2011).

3.7.6 Expressão da proteína Akt

A expressão da proteína Akt foi realizada pela técnica de Western blot (WB) para isso, o pulmão foi processado e imediatamente homogeneizado (n de seis animais, *pool* de tecidos) em tampão específico contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de ortovanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina. O homogeneizado foi então centrifugado a 11.000 rpm por 30 minutos, a 4°C. No sobrenadante foi determinada a concentração de proteínas totais (por teste colorimétrico), utilizando para isso o método de Bradford (1976). As proteínas foram ressuspensas e conservadas em tampão de Laemmli (1970), contendo 100 mmol/L de Dithiothreitol (DTT) e posteriormente foi realizada a determinação do imunoblot com anticorpo específico. Para isso, alíquotas contendo 250µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da *BioRad* (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. As proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose utilizando equipamento de eletrotransferência de minigel da *BioRad*. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora por 2 horas, a temperatura ambiente, para diminuir as ligações proteicas inespecíficas. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpos Akt, sob agitação constante, *overnight* e a 4°C. A seguir, as membranas foram incubadas em solução com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, durante 2 horas à temperatura ambiente. Após, as membranas foram incubadas por dois minutos em substrato enzimático e expostas a filme de RX em cassete de revelação radiográfica. A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das radiografias reveladas por densitometria ótica, utilizando um *scanner* (HP 3400) e o programa *ImageJ* (*Image processing and analysis in Java*).

3.7.7 Ensaios de genotoxicidade

Para realização dos testes de genotoxicidade, foram utilizadas amostras biológicas de sangue e pulmão dos camundongos, para duas versões do ensaio cometa.

3.7.7.1 Ensaio cometa alcalino

O ensaio cometa (EC) foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações sugeridas por Tice et al. (2000). O sangue foi coletado e colocado em microtubos heparinizados e refrigerados, e as amostras de pulmão foram dissecadas e imersas em tampão Merchant's refrigerado. Em seguida elas foram individualmente homogeneizadas com o auxílio de uma seringa, através do movimento de vai e vem, a fim de obter uma suspensão celular. As células do sangue (alíquotas de 5 μ L) e as células obtidas da dissociação de tecidos (alíquotas de 25 μ L) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0.75%, w/v, 95 μ L ou 75 μ L, respectivamente). A mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), coberta posteriormente com uma lamínula e levada, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4°C para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 1 semana. As lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para o desenovelamento do DNA, a corrida eletroforética, foi realizada no mesmo tampão nas seguintes condições: a 25v e 300mA por 15 minutos. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca amarela. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado com Syber Gold (Sigma Brasil, 1239-45-8) para posterior análise. Foi realizada avaliação de 100 células por indivíduo e por tecido (50 células em cada lâmina duplicada). Tais células foram avaliadas visualmente, sendo classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda, sendo a classificação para ausência de cauda considerada 0, até 4 para o comprimento máximo de cauda (Collins et al., 1997). Desta forma, tem-se um Índice de Danos (ID) para cada animal variando de zero ($100 \times 0 = 0$; 100 células

observadas completamente sem danos) a 400 (100 X 4 = 400; 100 células observadas com dano máximo). Calcula-se a frequência de danos (FD em %) em cada amostra com base no número de células com cauda versus o número de células sem cauda. As diretrizes internacionais e recomendações para o ensaio do cometa consideram que o escore visual de 100 cometas é um método de avaliação bem validado. Ele tem uma alta correlação com a análise de imagem por computador (Collins et al., 1997). Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

3.7.7.2 Ensaio Cometa com tratamento enzimático

O Ensaio Cometa modificado foi realizado como descrito por Azqueta e Collins (2013). Para a medição de purinas oxidadas, após o período de incubação na lise, as lâminas foram lavadas 3 vezes (5 min a cada vez) com tampão gelado (KCl 0,1 M, Na₂EDTA 0,5 mM, HEPES 40 mM, BSA 0,2 mg/mL, pH 8,0) e incubadas durante 40 min a 37°C com FPG (formamino pirimidina glicosilase) (na diluição recomendada pelo fabricante) ou tampão. As etapas seguintes foram realizadas de acordo com a versão alcalina do Ensaio Cometa, descrita no item anterior. Os parâmetros índice e frequência de danos foram os parâmetros de dano do DNA avaliado para descrever a formação de cometas. Os sítios sensíveis à FPG foram calculados através da diferença entre o valor obtido para ID e FD na cauda dos núcleos tratados com tampão e do valor obtido para ID e FD dos núcleos tratados com FPG.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos na determinação dos parâmetros foram expressos como média \pm erro padrão da média, e analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) one-way *post test* de Neuman-Keuls e two-way, seguida do teste *post hoc* Bonferroni. Foi adotado nível de significância $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada através do software *GraphPad Prism*® (versão 5.00), para *Microsoft Windows*®.

4 RESULTADOS

Como o objetivo principal desse estudo foi comparar os efeitos da exposição ao material particulado proveniente da combustão de motor a diesel DEP sobre parâmetros histopatológicos, inflamatórios e genotoxicidade em pulmão de camundongos praticantes e não praticantes de exercício físico; e como já esta amplamente documentado na literatura os efeitos deletérios de DEP em pulmão de camundongos, este estudo priorizou comparar os resultados entre grupos de camundongos exercitados e não exercitados em diferentes concentrações de DEP.

Os resultados a seguir, demonstram as diferenças na modulação de parâmetros histopatológicos e na oxidação e reparo de proteínas constitutivas intra e extracelular no pulmão de animais treinados e não treinados, expostos ao material particulado (MP_1) proveniente da combustão de motor a diesel (DEP) nas concentrações de 500, 1.000 e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ respectivamente.

A figura 11 (A-F) exibe imagens representativas de cortes histológicos em plano longitudinal do tecido pulmonar de camundongos submetidos a protocolo de exercício físico com exposição controlada de DEP nas seguintes concentrações; 500, 1.000 e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e também de animais expostos ao mesmo nível de particulado não exercitados. Como se pode observar na Figura 11 A, o grupo dos animais não treinados expostos a 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de poluição, apresentou poucas áreas com alargamento alveolar e maior integridade da histoarquitetura pulmonar quanto a espessura dos septos alveolares e alvéolos (seta contínua). Na Figura 11 B, o grupo dos animais não treinados expostos a 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de poluição, observa-se parênquima pulmonar de aspecto normal e integridade alveolar preservada (seta contínua). Na Figura 11 C, o grupo dos animais não treinados e expostos a 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de poluição, foi possível observar aumento do diâmetro alveolar e destruição de septo alveolar (seta contínua). Na Figura 11 D, o grupo dos animais treinados expostos a 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de poluição, observa-se áreas de parênquima pulmonar de aspecto normal e integridade alveolar preservada (seta contínua). Na Figura 11 E o grupo dos animais treinados expostos a 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de poluição, foi possível observar áreas de aumento do diâmetro alveolar (seta contínua). Já na Figura 11 F, animais treinados e expostos a 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de poluição, a histoarquitetura pulmonar apresenta-se com espessamento de septo alveolar e áreas com destruição de septo e aumento do diâmetro alveolar (seta contínua).

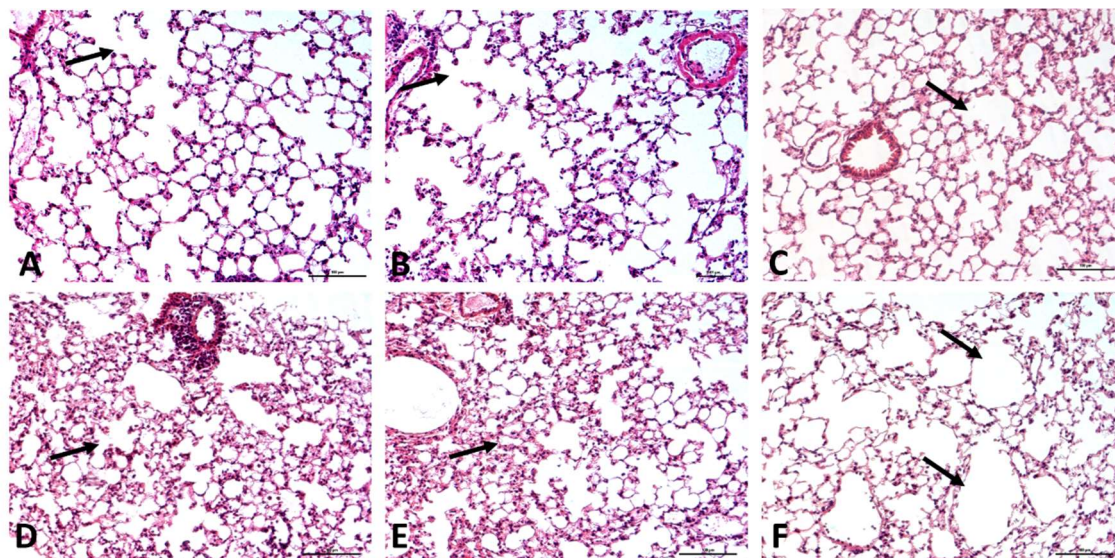


Figura 11 - Cortes histológicos de tecido pulmonar corados em H&E. Em A - animais não treinados e expostos a 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de DEP. B - animais não treinados e expostos a 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de DEP. C - animais não treinados e expostos a 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de DEP. D - animais treinados e expostos a 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de DEP. E animais treinados e expostos a 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de DEP. F - animais treinados e expostos a 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de DEP. Os dados foram quantificados com tratamento estatístico segundo análise de variância entre os grupos, ANOVA com post test de Neuman-Keuls e $p < 0.05$. Aquisição de imagens em objetiva de 20x.

A quantificação do enfisema foi determinada por estereologia, a partir do diâmetro alveolar médio. Como observado na Figura 12, há diferença significativa (a) entre animais não exercitados na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ para 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p < 0,05$) e também fica evidenciado diferença significativa (b) quando se compara os animais não exercitados na concentração de 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ para animais exercitados na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p < 0,05$). O grupo 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dos animais não exercitados apresentou aumento da área alveolar comparada ao grupo exposto 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ para os animais exercitados e não exercitados, porém não foi constatado diferença significativa ($p < 0,05$) quando se compara os grupos exercitados e não exercitados nas mesmas concentrações, assim, não é possível afirmar que o exercício físico afetou significativamente a proporção volumétrica de fibras de colágeno no parênquima pulmonar.

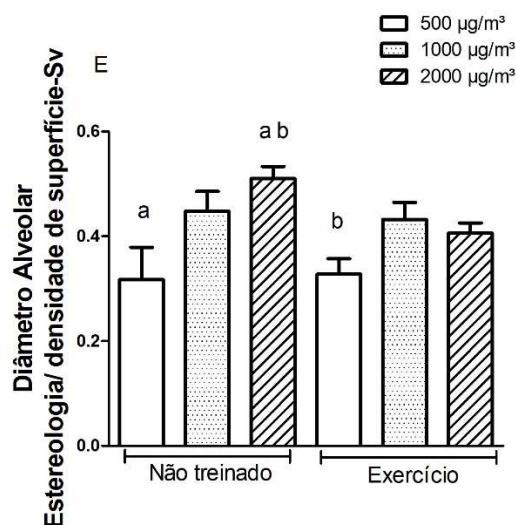


Figura 12 - Quantificação estereológica do diâmetro alveolar. a – Diferença significativa entre as concentrações de 500 µg/m³ e 2.000 µg/m³ ($p < 0,05$); b – Diferença significativa entre as concentrações de 2.000 µg/m³ (não treinado) e 500 µg/m³ (exercício) ($p < 0,05$). Para a estereologia foi utilizado análise de Variância, ANOVA com post-test de Newman-Keuls, ($p \leq 0,05$). N = 6/ por grupo. Aquisição de imagens em objetiva de 20x.

Os dados apresentados na Figura 13 A demonstram os efeitos sobre a quantidade total de leucócitos decorrentes da exposição as concentrações de 500 µg/m³, 1.000 µg/m³ e 2.000 µg/m³ de DEP em lavado broncoalveolar de animais exercitados e não exercitados. É possível constatar diferença significativa ($p < 0,01$) (a) nos animais não exercitados quando se compara as concentrações de 500 µg/m³, 1.000 µg/m³ e 2.000 µg/m³ de DEP ao grupo controle. Constata-se ainda diferença significativa quando se compara o grupo exercício na concentração de 2.000 µg/m³ (b) também comparado ao grupo controle ($P < 0,01$). Contudo, não se constata diferença significativa entre animais exercitados e não exercitados nas diferentes concentrações, porém observa-se que nas concentrações de 500 e 1.000 µg/m³ o grupo de animais exercitados não apresenta diferença significativa do grupo de controle.

Os dados apresentados na Figura 13 B demonstram que a exposição as concentrações de 500 µg/m³, 1.000 µg/m³ e 2.000 µg/m³ de DEP não apresentaram alterações significativas ($P < 0,05$) nos níveis de ERO em lavado broncoalveolar (LBA) comparando os grupos de animais exercitados em não exercitados. Não ficou evidenciado efeito significativo de interação entre as diferentes concentrações de particulado com o exercício.

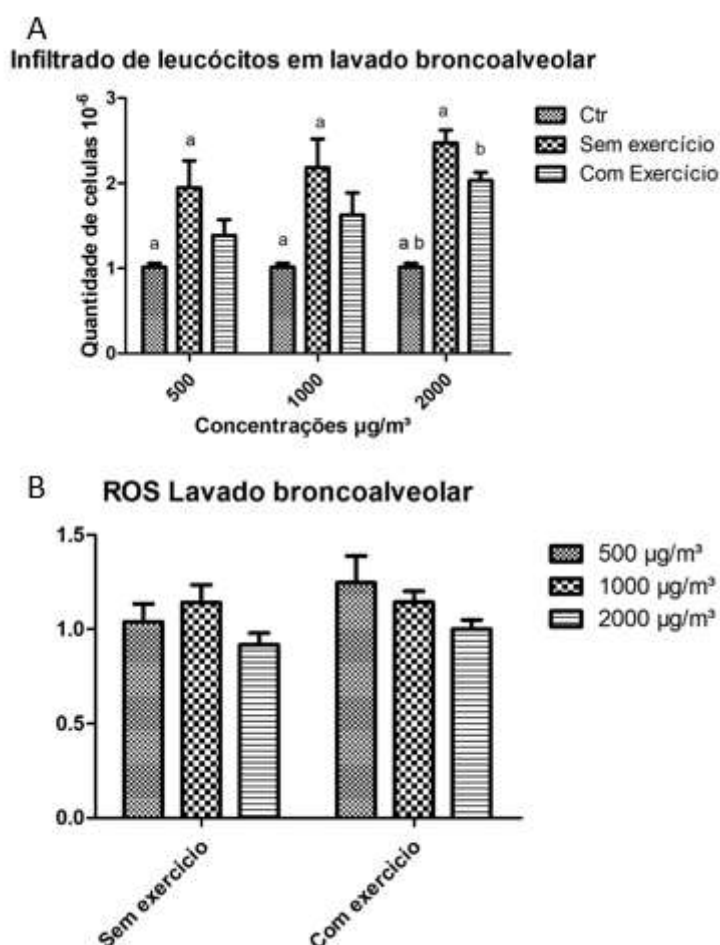


Figura 13 – Efeitos sobre a quantidade total de leucócitos e nos níveis de espécies reativas de oxigênio expostos a DEP. Em **A** - Contagem total de leucócitos em amostras de LBA de camundongos expostos a DEP. Células nucleadas contadas nos quatro quadrantes externos da câmara de Neubauer. a – Diferença significativa comparado o grupo sem exercício ao grupo de controle ($p < 0,01$); b – Diferença significativa comparado o grupo com exercício ao grupo de controle ($p < 0,01$); Em **B** - Espécies reativas de oxigênio em LBA de camundongos expostos a DEP. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do post-hoc de Bonferroni. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de P foram menores que 0,05 ($p < 0,05$).

Como observado na Figura 14, a produção de DCF, um produto da oxidação de 2,7-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) por espécies reativas de oxigênio, em especial o peróxido de hidrogênio, apresentou diferença significativa (a) entre as concentrações de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ no grupo exercício ($p < 0,05$); também foi encontrado diferença significativa (b) entre as concentrações de 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ no grupo exercício ($p < 0,05$); não foi constatada diferença significativa na produção de DCF quando comparado animais exercitados e não exercitados expostos as diversas concentrações de DEP.

Embora a produção de malondialdeído (MDA), produto secundário da peroxidação lipídica, foi menor nos grupos exercitados comparado aos não exercitados, só foi constatado diferença significativa (a) entre animais exercitados e não exercitados na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p < 0,05$). Constatou-se ainda, diferença significativa (b) entre as concentrações de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ no grupo sem exercício ($p < 0,05$) e diferença significativa (c) entre as concentrações de 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ no grupo sem exercício ($p < 0,05$).

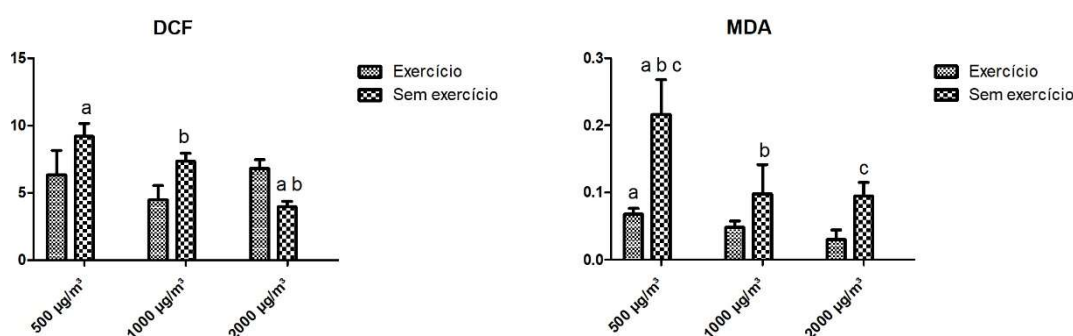


Figura 14 - Efeitos da exposição ao DEP sobre o sistema oxidante em pulmão de camundongos. DCF e MDA Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do post-hoc de Bonferroni. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de P foram menores que 0,05 ($p < 0,05$).

No sistema antioxidante foram dosadas as enzimas do sistema glutaciona, superóxido dismutase e catalase. Pode-se observar na figura 15 A diferença significativa na expressão de SOD (a) entre as concentrações de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ no grupo sem exercício ($p < 0,05$) e diferença significativa (b) entre as concentrações de 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ no grupo sem exercício ($p < 0,05$). Na expressão de SOD, não houve diferença significativa entre os animais dos grupos exercitados e não exercitados. Na figura 15 B se observa a atividade da enzima catalase, que catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, sendo constatado diferença significativa (b) entre as concentrações de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ no grupo exercício ($p < 0,05$); Diferença significativa (c) entre as concentrações de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ no grupo sem exercício ($p < 0,05$). Quando comparados os grupos com e sem exercício, há diferença significativa (c) nas concentrações de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p < 0,05$) com aumento dos níveis de CAT no grupo de animais não exercitados, porém, na concentração de 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p < 0,05$) estes

valores se inverteram, sendo constatado aumento dos níveis de CAT no grupo de animais exercitados.

No sistema glutathiona observa-se diferenças significativas na enzima GSSG (figura 15 D), entre as concentrações (a) de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ no grupo sem exercício ($p < 0,05$); Diferença significativa (b) entre as concentrações de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ no grupo sem exercício ($p < 0,05$). Quando comparados os grupos exercício e não exercício houve diferença significativa concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p < 0,05$) com aumento dos níveis de GSSG no grupo de animais não exercitados.

No entanto, quando dosadas as enzimas GSht (figura 15 C) e calculada a relação GSG/GSSG (figura 15 E) não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos exercício e sem exercício nas três diferentes concentrações de partículas de DEP.

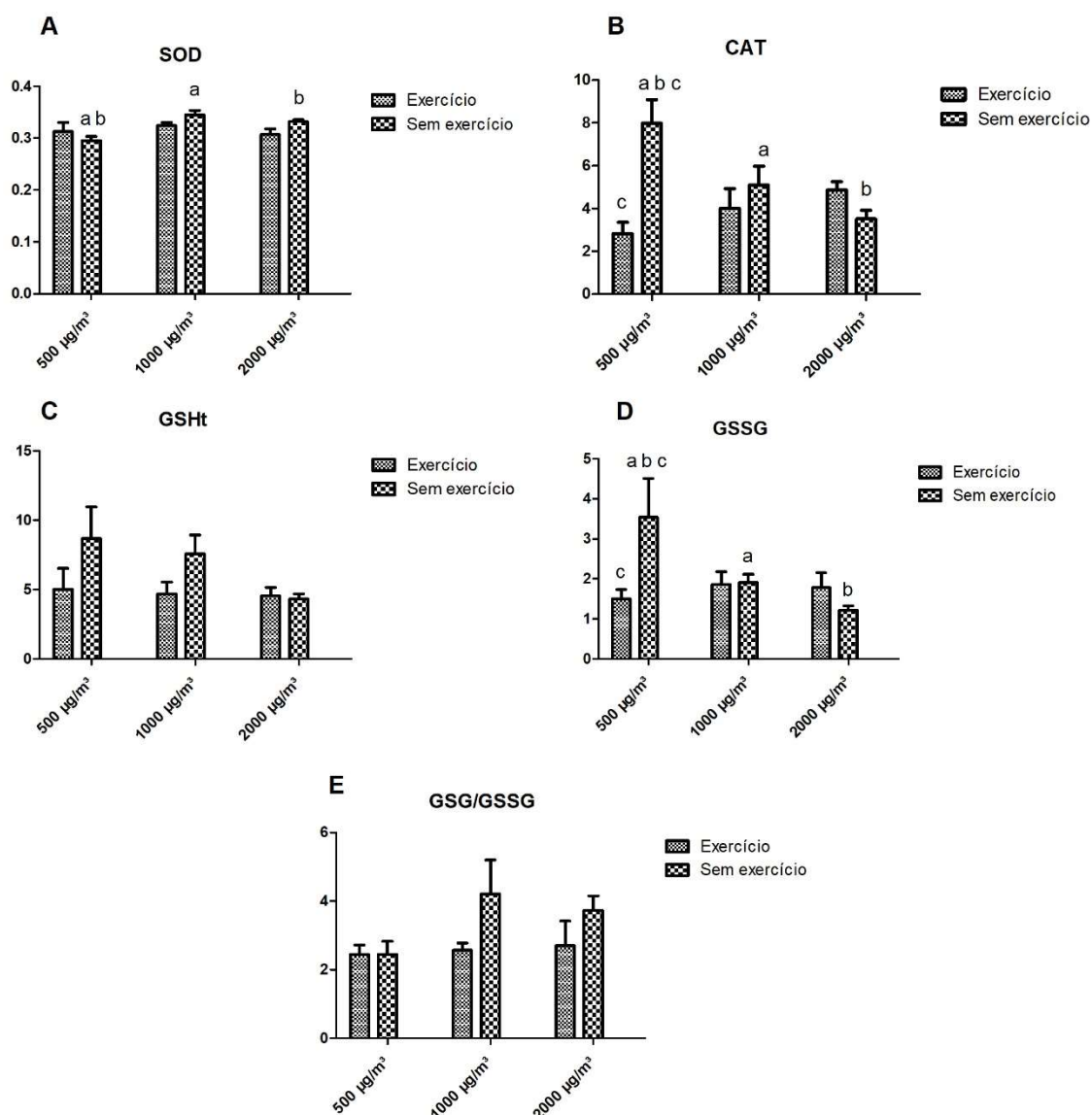


Figura 15 (A-E). Efeitos da exposição ao DEP sobre o sistema antioxidante em pulmão de camundongos. Sistema glutaciona, SOD e CAT. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do post-hoc de Bonferoni. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de P foram menores que 0,05 ($p < 0,05$).

Amostras de homogeneizado pulmonar foram processadas para avaliar os biomarcadores pró-inflamatórios $\text{TNF}\alpha$, IL-1 e IL-6 (Figura 16). Os níveis de $\text{TNF}\alpha$ não foram influenciados pela exposição ao DEP quando comparamos os grupos de exercício e não exercício. Constatamos diferença significativa (a) somente quando comparamos as concentrações de $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e $2.000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ no grupo sem exercício ($p < 0,05$).

A IL-1 que é um dos mais importantes marcadores de indução da resposta inflamatória associada à infecção aguda, sofreu alterações quando comparamos os animais exercitados e não exercitados. Quando comparamos os grupos exercício e

sem exercício, ficou constatada aumento significativo nos níveis de IL-1 no grupo sem exercício nas concentrações de (a) 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p < 0,001$), (b) 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p < 0,001$), e (c) 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p < 0,001$), quando comparado com o grupo sem exercício. Constatou-se ainda diferença significativa entre as concentrações de (d) 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p < 0,001$) e (e) 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p < 0,001$) no grupo exercício.

Conforme se pode constatar na Figura 16, quando comparamos os grupos exercício e sem exercício, não foi verificada diferença significativa nos níveis de IL-6. Houve apenas diferença significativa entre as concentrações de (a) 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p < 0,05$) e (b) 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 ($p < 0,05$) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ no grupo sem exercício.

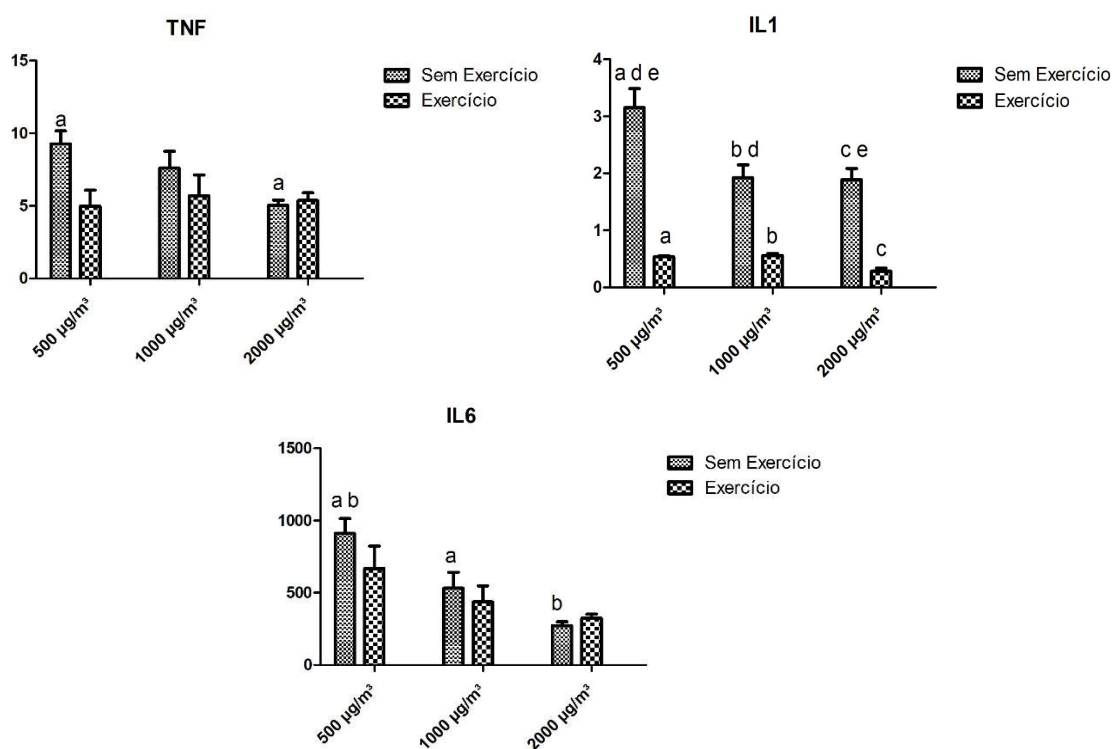


Figura 16- Efeitos da exposição ao DEP sobre moléculas envolvidas no processo inflamatório em pulmão de camundongos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do post-hoc de Bonferoni. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de P foram menores que 0,05 ($p < 0,05$).

Pela técnica de WB também foi avaliado no pulmão a proteína serina-treonina quinase Akt (também conhecida como PKB), proteína efetora central do PIP3. Conforme a figura 16, foi encontrada diferença significativa comparando as concentrações de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (a) ($p < 0,01$) e entre as concentrações de 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (b) no grupo exercício ($p < 0,05$);

Também ficou evidenciado diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado o grupo de controle com os grupos com e sem exercício na mesma concentração (c). Aumentos na expressão da proteína Akt comparado com o grupo de controle indicam efeitos deletérios provocados pelo DEP em pulmão de camundongos.

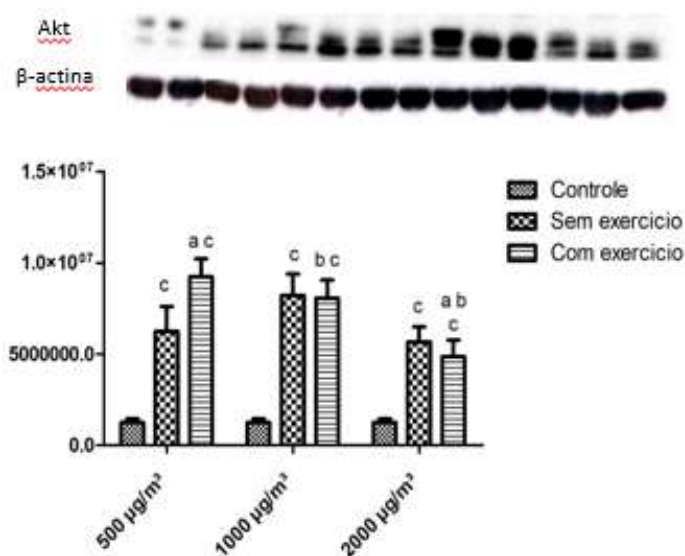


Figura 17 - Efeitos da exposição a DEP sobre a expressão da proteína Akt total em pulmão de camundongos. a - diferença significativa entre as concentrações de 500 µg/m³ e 2.000 µg/m³ no grupo exercício ($p < 0,01$) b - diferença significativa entre as concentrações de 1.000 µg/m³ e 2.000 µg/m³ no grupo exercício ($p < 0,05$) c - diferença significativa comparada com o grupo de controle na mesma concentração ($p < 0,001$). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do post-hoc de Bonferoni. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de P foram menores que 0,05 ($p < 0,05$).

Amostras de sangue foram coletadas para avaliar o índice e a frequência de dano em DNA. A primeira coleta foi realizada 4 semanas após o início do treinamento e exposição a DEP e a segunda coleta foi realizada após 8 semanas.

Conforme a Figura 18, a frequência de dano em DNA, apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) nas concentrações (a) de 500 µg/m³ e 1.000 µg/m³ no grupo exercício, e nas concentrações de 500 µg/m³ e 2.000 µg/m³ no grupo sem exercício comparadas com o grupo controle. No índice de dano em DNA houve diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração (a) de 500 µg/m³ no grupo exercício, e nas concentrações de 1.000 µg/m³ e 2.000 µg/m³ no grupo sem exercício. Não houve diferença significativa quando comparado os grupos exercitados e não exercitados nas diferentes concentrações tanto na frequência quanto no índice de dano.

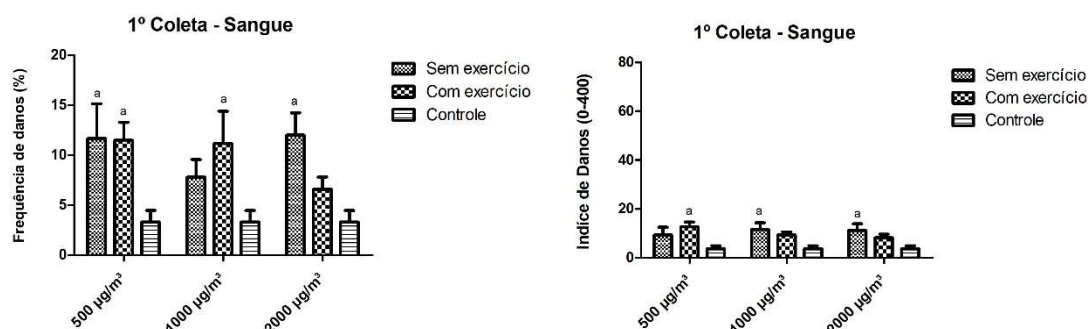


Figura 18 - Avaliação de genotoxicidade devido a exposição ao DEP em sangue de camundongos expostos as concentrações de 500 µg/m³, 1.000 µg/m³ e 2.000 µg/m³ (4 semanas). a – Diferença significativa em relação ao grupo controle na mesma concentração ($p < 0,05$); Avaliação através do Ensaio cometa. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do post-hoc de Bonferoni. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de P foram menores que 0,05 ($p < 0,05$).

Na segunda coleta realizada antes da eutanásia dos animais (após 8 semanas de exposição ao DEP), conforme se constata na Figura 19, a frequência e o índice de dano em DNA, apresentou diferença significativa ($p < 0,001$) nas concentrações (a) de 500 µg/m³, 1.000 µg/m³ e 2.000 µg/m³ tanto para o grupo exercício quanto para o grupo de animais não exercitados quando comparadas com o grupo controle, porém, o índice de dano apresentou diferença significativa (b) entre animais do grupo exercício e não exercício nas concentrações de 500 µg/m³ ($p < 0,05$) e 1.000 µg/m³ ($p < 0,01$) de DEP.

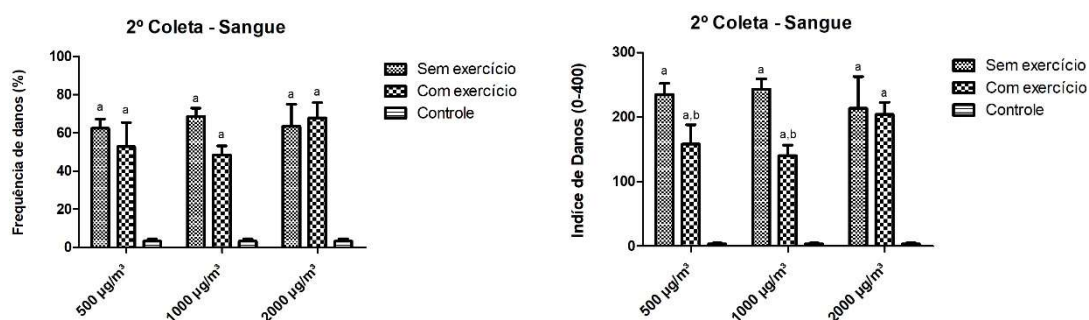


Figura 19 - Avaliação de genotoxicidade devido a exposição ao DEP em sangue de camundongos expostos as concentrações de 500 µg/m³, 1.000 µg/m³ e 2.000 µg/m³ (8 semanas). a – diferença significativa em relação ao grupo controle na mesma concentração ($p < 0,05$); b – diferença significativa em relação ao grupo sem exercício em diferentes concentrações ($p < 0,05$); Avaliação através do Ensaio cometa. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do post-hoc de Bonferoni. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de P foram menores que 0,05 ($p < 0,05$).

A Figura 20 destina-se a uma comparação de genotoxicidade entre 1ª e 2ª coletas de sangue nas concentrações de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Pode-se observar aumento significativo tanto no índice de dano quanto na frequência que o dano em DNA ocorre. Na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ a frequência de dano em DNA aumentou da primeira para a segunda coleta de aproximadamente 11% (grupo com e sem exercício) para 62,40% (grupo sem exercício) e 43% (com exercício). Na concentração de 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ a frequência de dano na primeira coleta foi inferior a 10% (grupo com e sem exercício) aumentando para 68,6% (grupo sem exercício) e 48,5% (com exercício). Na concentração de 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ a frequência de dano na primeira coleta foi de 10% nos grupos com e sem exercício, aumentando para 63,4% no grupo sem exercício e 67,75% no grupo exercitado.

Resultado similar ocorreu com o índice de dano em DNA (avaliado em uma escala de 0-400) onde na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ aumentou de aproximadamente 12 pontos (grupo com e sem exercício) para 234 pontos no grupo sem exercício e 158 pontos no grupo exercício. Na concentração de 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ o índice de dano na primeira coleta foi inferior a 13 pontos (grupo com e sem exercício) aumentando para 243 pontos (grupo sem exercício) e 115 pontos (com exercício). Na concentração de 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ o índice de dano na primeira coleta foi inferior a 11 pontos nos grupos com e sem exercício, aumentando para 213,6 pontos no grupo sem exercício e 204 pontos no grupo exercitado.

Comparando o índice e a frequência de dano em DNA entre a primeira e a segunda coleta nas concentrações de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ há evidências que a exposição ao DEP pode causar dano epigenético.

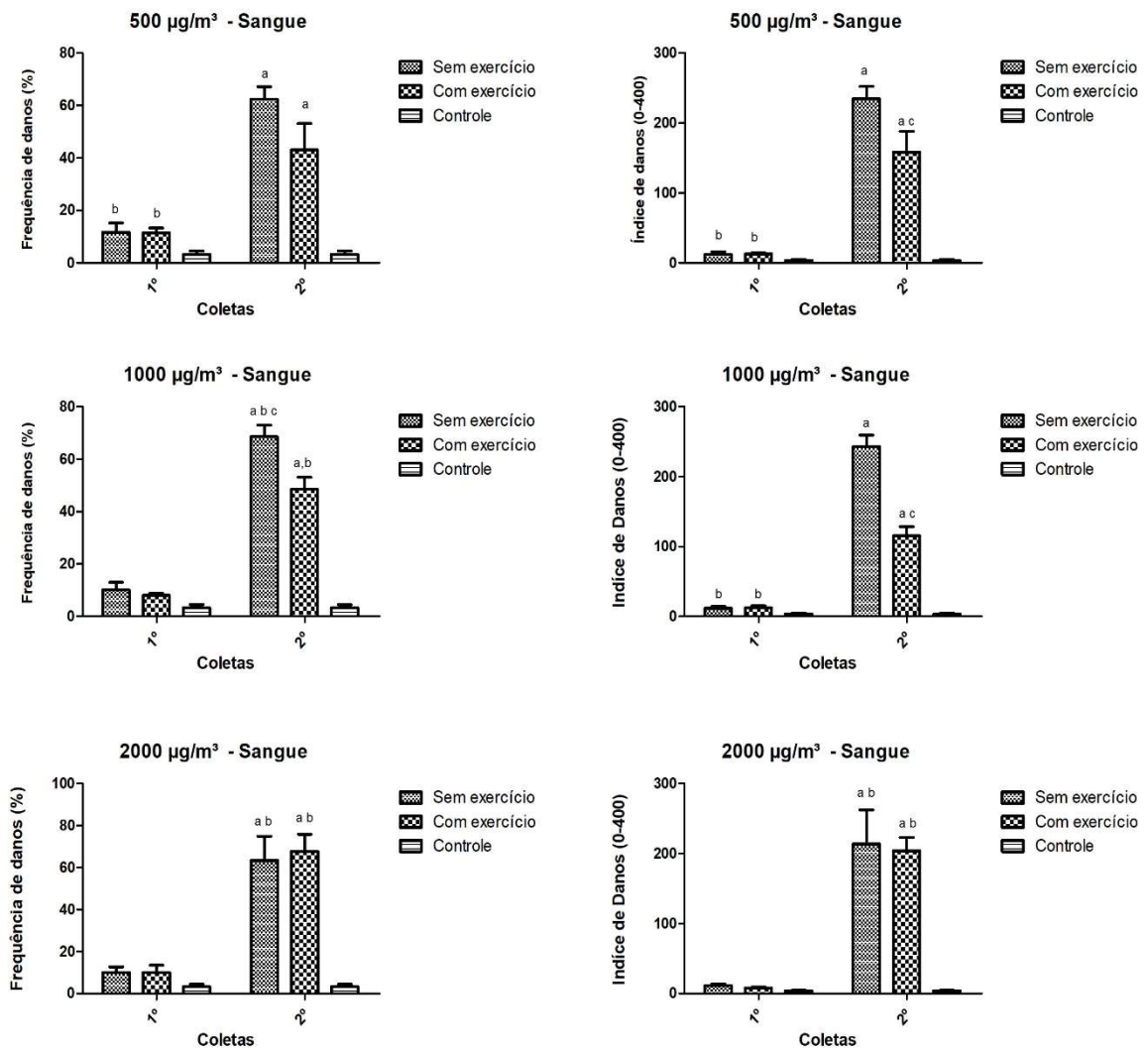


Figura 20 - Comparação de genotoxicidade entre 1ª e 2ª coletas de sangue nas concentrações de 500 µg/m³, 1.000 µg/m³ e 2.000 µg/m³ em camundongos expostos ao DEP. a – Diferença significativa em relação ao grupo controle na mesma coleta ($p < 0,05$); b – Diferença significativa entre 1º e 2º coleta, no mesmo tratamento ($p < 0,05$); c – Diferença significativa entre em relação ao grupo sem exercício na mesma coleta ($p < 0,05$); Avaliação através do Ensaio cometa. Os dados expressos como média \pm desvio padrão da média e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do post-hoc de Bonferroni. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de P foram menores que 0,05 ($p < 0,05$).

A frequência e o índice de dano em DNA também foram avaliados no pulmão dos animais. Conforme a Figura 20, na frequência de dano há diferença significativa (a) entre os animais do grupo de controle e não treinados expostos a concentração de 1.000 µg/m³. Também há diferença significativa (b) quando se compara o grupo de controle com os animais exercitados nas concentrações de 1.000 µg/m³ e 2.000 µg/m³. Igualmente, há diferença significativa (c) entre as concentrações 1.000 µg/m³ e 2.000 µg/m³ nos animais não exercitados.

Quanto ao índice de dano em DNA, a concentração de 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ apresentou diferença significativa quando comparado animais não exercitados (a) e exercitados (b) ao grupo de controle. Na concentração de 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ constatou-se diferença significativa (d) em relação à concentração de 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ no grupo de animais exercitados ($p < 0,05$). Comparando os grupos não exercitados nas diferentes concentrações de MP_1 não houve diferença significativa.

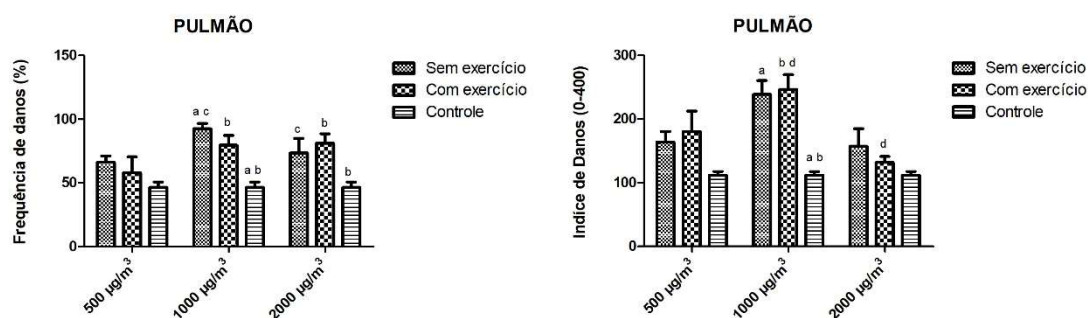


Figura 21 - Efeitos da exposição ao MP_1 no pulmão de camundongos expostos as concentrações de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. a – diferença significativa do grupo sem exercício em relação ao grupo controle na mesma concentração ($p < 0,05$); b – diferença significativa do grupo com exercício em relação ao grupo controle na mesma concentração ($p < 0,05$); c – diferença significativa no grupo sem exercício em diferentes concentrações ($p < 0,05$); d – diferença significativa no grupo com exercício em diferentes concentrações ($p < 0,05$); Avaliação de genotoxicidade através do Ensaio cometa. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do post-hoc de Bonferroni. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de P foram menores que 0,05 ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

O exercício físico regular reduz o risco de desenvolver doenças crônicas, como doenças cardíacas, diabetes tipo 2, câncer e acidente vascular cerebral (Blair e Morris, 2009; WHO, 2010; Lee et al., 2012; Weichenthal et al., 2014). No entanto, algumas formas acessíveis de exercício, como caminhar, correr ou andar de bicicleta, ocorrem ao ar livre perto de fontes de maior poluição do ar relacionada ao tráfego o que pode aumentar a exposição a poluentes atmosféricos (Chiu e Yang, 2009; Strak et al. 2010; Giles e Koehle 2014; Weichenthal et al. 2014).

Evidências epidemiológicas têm demonstrado que a exposição a poluentes atmosféricos relacionados ao tráfego, como material particulado, na faixa fina (<2,5 µm; MP_{2,5}) e ultrafina (<0,1 µm; UFP), e gases como dióxido de nitrogênio (NO₂), o monóxido de carbono (CO) e o ozônio (O₃) podem afetar adversamente o sistema respiratório e cardiovascular (WHO, 2005; Cheng, Tsai e Yang, 2009; Beckerman et al., 2012; Costa et al., 2014; WHO 2014, Oliveira et al., 2014; Greenberg et al., 2016). Além disso, vários estudos também observaram inflamação das vias aéreas em grupos sensíveis (Adar et al., 2007) e em pessoas saudáveis (Strak et al., 2010; Weichenthal et al., 2011; Strak et al., 2012) e efeitos sistêmicos como aumento de granulócitos neutrofílicos (Riediker et al., 2004; Jacobs et al., 2010) e outros marcadores sanguíneos infamatórios (Riediker et al., 2004).

Estudos têm demonstrado redução da função pulmonar em associação com andar em uma rua movimentada (McCreanor et al., 2007; Sinharay et al., 2017), correr perto de estradas movimentadas (Rundell et al., 2008) ou andar de bicicleta na hora do *rush* em uma rota de tráfego pesado (Strak et al., 2010; Giles, Carlsten e Koehle 2012; Andersen et al., 2015). Portanto, postula-se que pessoas que realizam exercício físico regular ao ar livre nessas condições estão mais susceptíveis aos efeitos negativos e nocivos da poluição comprometendo os efeitos positivos do próprio exercício. Deste modo, este estudo buscou verificar as alterações bioquímicas e moleculares induzidas pelo material particulado proveniente da combustão de motor a diesel em pulmão de camundongos expostos a um programa de treinamento físico.

No presente estudo, os camundongos expostos as concentrações de 500, 1.000 e 2.000 µg/m³ de MP₁ de DEP, apresentaram diferenças na modulação de parâmetros histopatológicos e na oxidação e reparo de proteínas constitutivas intra e extracelular no pulmão quando comparado animais treinados e não treinados.

Na histoarquitetura pulmonar de animais treinados e não treinados, expostos a concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de poluição, os cortes histológicos de tecido pulmonar apresentaram poucas áreas com alargamento alveolar e maior integridade da histoarquitetura pulmonar quanto a espessura dos septos alveolares e alvéolos quando comparados com o grupo dos animais treinados expostos a mesma concentração de poluição, o que pode caracterizar efeito protetor do exercício físico. Na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de DEP, nossos achados são compatíveis com o estudo realizado por Vieira et al. (2012), afirmando que o exercício aeróbico reduziu o remodelamento do parênquima pulmonar induzido pela DEP, indicando o benefício potencial do exercício aeróbico a longo prazo na prevenção de alterações estruturais no parênquima pulmonar associadas a condições inflamatórias crônicas.

Porém, outros estudos apontam que o efeito do $\text{MP}_{2.5}$ é aumentado durante o exercício (Sharman e Stowasser, 2009), aumentando a deposição nos pulmões (Rundell et al., 2008), induzindo alterações estruturais. Nossos resultados histológicos na concentração de 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ são compatíveis com esses estudos, pois apresentam áreas de alargamento do espaço aéreo-alveolar interpostas por regiões de infiltrado celular compatíveis com enfisema pulmonar tanto no grupo de animais exercitados quanto não exercitados expostos ao DEP. Os dois grupos demonstram histoarquitetura compatível com enfisema pulmonar. O remodelamento pulmonar é provavelmente uma consequência da inflamação crônica não resolvida e está associado a alterações funcionais nas vias aéreas e doenças pulmonares intersticiais (Leigh et al., 2004; Morales et al., 2011) e envolve a deposição de proteínas de matriz extracelular (Golestani et al., 2016). Vieira et al. (2012) também constataram que a exposição a partículas de diesel aumentou o remodelamento do parênquima pulmonar.

Os dados estereológicos do presente estudo confirmam os resultados histológicos no grupo de animais não treinados e expostos a 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de MP_1 , mostrando um aumento do diâmetro alveolar compatível com o enfisema, no entanto, não foi constatado diferença significativa ($P < 0,05$) quando se compara os grupos de animais exercitados e não exercitados nas mesmas concentrações. Deste modo, não é possível afirmar que o exercício físico foi eficiente para inibir, reduzir ou aumentar as alterações histológicas em animais expostos a concentração de 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de DEP.

Após análise histológica e estereológica, foi realizada a contagem total de leucócitos em amostras de LBA. Nossos achados em marcadores inflamatórios pulmonares são consistentes com a hipótese de que o MP inalado induz a liberação de mediadores pró-inflamatórios levando a uma resposta inflamatória local (Danesh et al. 2000). Em estudos de exposição humana controlada (Nordenhäll et al., 2000; Stenfors et al., 2004), a inalação de exaustão de diesel foi associada com aumento da resistência e inflamação das vias aéreas em indivíduos saudáveis apresentando aumento de neutrófilos, linfócitos e mastócitos e níveis elevados de IL-8, IL-6 e mieloperoxidase em LBA, biópsias brônquicas e escarro.

Smyth et al. (2017) relatam que o mecanismo de inflamação dos materiais em nanoescala podem translocar-se através da barreira epitelial pulmonar e entrar na circulação corroborando com os achados de (Van Eeden et al., 2001; Van Eeden e Hogg, 2002) que afirmam que os mediadores inflamatórios podem deixar o pulmão e entrar na circulação, induzindo efeitos sistêmicos.

Segundo Solomon et al. (2013), as partículas de DEP podem interagir fisicamente com plaquetas isoladas, levando a ativação e agregação. Smyth et al. (2017) mostraram que as DEP administrada nos pulmões de camundongos através de instilação (MP_{0,1}) causou um aumento significativo na agregação plaquetária *in vivo* 4 horas pós-exposição evidenciando sua ação sistêmica. Den Hartigh et al. (2010) demonstraram que alguns componentes do material particulado estão envolvidos na ativação de células endoteliais, o que resultou na coativação adicional de monócitos circulantes.

Diversos estudos relatam que a infiltração de leucócitos nos pulmões após a exposição à DEP (Nemmar et al., 2003; Robertson et al., 2012; Xu et al., 2013). Nossos achados confirmam tais afirmações sendo possível constatar diferenças significativas quando comparamos animais expostos e não exercitados as concentrações de 500 µg/m³, 1.000 µg/m³ e 2.000 µg/m³ de DEP ao grupo controle. Contudo, tais achados se reportam unicamente aos efeitos do DEP no metabolismo animal, pois não constatamos diferenças significativas entre animais exercitados e não exercitados nas diferentes concentrações 500 µg/m³, 1.000 µg/m³ e 2.000 µg/m³ de DEP. Porém, em nossos achados é possível observar que os animais exercitados nas concentrações de 500 e 1.000 µg/m³, não apresentam diferença significativa do grupo controle, o que sugere um efeito protetor do exercício físico a exposição a essas concentrações de DEP. Resultados similares ao presente estudo foram encontrados

por Zhang et al. (2018), que realizaram um estudo em humanos e encontraram menor contagem total e diferencial de leucócitos em pessoas praticantes de exercício físico quando comparada a não praticantes de exercício físico após a exposição ao MP_{2.5}. Embora em nossos achados não encontramos diferenças significativas em número total de leucócitos quando comparamos os animais exercitados aos não exercitados nas diferentes concentrações de DEP fica evidente que em concentrações menores de poluição, o exercício físico reverte os efeitos da poluição.

Ávila et al. (2015) também mostraram que a exposição a DEP por 10 dias resultou em um aumento significativo no número de células em LBA (células totais, neutrófilos e linfócitos), porém, quando os camundongos eram submetidos a sessões de natação de alta intensidade e administração de DEP mostraram uma diminuição no número de células totais, neutrófilos e linfócitos em LBA. Esses dados corroboram os de Vieira et al. (2012), que demonstraram uma diminuição nas células inflamatórias não apenas no LBA, mas também no parênquima pulmonar de camundongos expostos a DEP e submetidos a exercícios físicos. Vieira et al. (2012), constataram que citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , e TNF- α também foram aumentadas no LBA e no parênquima pulmonar após a instilação de DEP. Verificaram que os leucócitos no parênquima pulmonar estão envolvidos na liberação dessas citocinas e que o exercício aeróbico de baixa intensidade inibiu tanto a quantidade total de citocinas pró-inflamatórias quanto a ativação de leucócitos parenquimatosos.

Dados similares foram encontrados por Silva-Renno et al. (2018), que avaliam os efeitos da exposição ao MP durante a realização de exercício aeróbico na inflamação sistêmica. Constataram que a exposição ao MP_{2,5} e MP₁₀ aumentou o número de leucócitos no sangue, e que o exercício aeróbico de baixa intensidade foi capaz de inibir o acúmulo de células PMN e MN no parênquima pulmonar e no espaço peribrônquico, sugerindo um efeito protetor generalizado do exercício aeróbico ao longo de diferentes compartimentos pulmonares. Estudos realizados por Lauzon e Martin (2016) e Abbasi, Vieira e Northoff (2015) observaram que a exposição a MP_{2,5} e MP₁₀ resultou em inflamação das vias aéreas e do parênquima, por células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN), relacionado à hiperresponsividade das vias aéreas, especialmente em indivíduos suscetíveis, a limitação a prática de exercícios, estreitamento das vias aéreas e redução do fluxo de ar.

Além da contagem total de leucócitos em amostras de LBA, avaliamos os níveis das espécies reativas de oxigênio. Embora na literatura esteja descrito que o

material particulado induz o aumento do estresse oxidativo e nitrosativo induzindo também à liberação de citocinas pró-inflamatórias (Nemmar et al., 2007) e que as DEP aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico por macrófagos alveolares bem como a produção da citocinas pró-inflamatórias (Zhao et al., 2009), não encontramos diferenças significativas entre o grupo exercitado e não exercitado quando comparadas as concentrações de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de DEP.

Para avaliação do sistema oxidante, analisamos em homogeneizado pulmonar, as concentrações de DCF, um produto da oxidação de 2,7-DCFH por espécies reativas de oxigênio e o MDA, produto secundário da peroxidação lipídica. Quando comparamos os grupos exercício e não exercício não constatamos diferenças significativas nos níveis de DCF, embora de maneira geral os níveis de DCF estão ligeiramente aumentados no grupo de animais não exercitado, houve diferenças significativas apenas entre as concentrações de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ no grupo exercício. Embora a produção aumentada de oxidantes, como o peróxido de hidrogênio, desencadeia uma cascata de eventos celulares que culminam com danos oxidativos em biomoléculas, comprometendo a estrutura e função pulmonar (Bargagli et al., 2009), e, aumento nos níveis de DCF indicam produção de peróxido de hidrogênio na célula (Wojtala et al., 2014), o que sugere aumento de ROS, no presente estudo não se pode afirmar que a exposição a DEP de animais exercitados e não exercitados gerou aumento na produção de oxidantes, mais especificamente de DCF. Contudo, constatou-se aumento da atividade da enzima catalase (que catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular) nos animais não exercitados, sugerindo uma possível modulação dos efeitos benéficos do exercício relacionados à resposta anti-inflamatória e antioxidante induzida pelo exercício. Em níveis basais, atividades reduzidas de enzimas antioxidantes como a CAT, em detrimento da produção de oxidantes, sugerem menor proteção contra à exposição a ERO, entretanto, após a exposição a DEP o aumento da atividade da CAT observado nos animais não exercitados pressupõe produção aumentada de peróxido de hidrogênio no tecido pulmonar.

De maneira geral, os níveis de MDA também ficaram ligeiramente aumentados nos grupos sem exercício, porém constatou-se diferença significativa entre o grupo exercitado e não exercitado na concentração de 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Os resultados do presente estudo demonstraram que a exposição a DEP aumentou os níveis de MDA, sugerindo aumento de ERO e a realização de exercícios físicos reduziu os níveis de MDA. Há referências na literatura que o estresse oxidativo pode ser induzido por fatores endógenos, bem como exógenos; fontes exógenas de ERO incluem fatores ambientais, como tabagismo, dieta e exposição à poluição do ar, e MP (Kooter et al., 2010). Uma possível explicação para o aumento dos níveis de MDA é devido ao material particulado poder aumentar a produção de ERO intracelular, induzindo estresse oxidativo (Pinho et al., 2005) utilizando metais de transição como ferro e cobre, que podem gerar radicais hidroxila através da reação de Fenton (Ghio et al., 1999). Sabe-se também que os macrófagos alveolares ingerem e removem partículas inaladas dos pulmões, e os neutrófilos também respondem a essas partículas (MacNee e Donaldson, 2003). A ativação de macrófagos resulta em liberação de citocinas, bem como de ERO, através da chamada explosão respiratória (respiratory burst) (Goldsmith et al., 1998).

Além disso, elevadas concentrações de agentes oxidantes no pulmão diminuem a capacidade antioxidante, o que contribui para o dano às células epiteliais (Comhair e Erzurum, 2002), favorecendo ainda mais a resposta inflamatória. Kooter et al. (2010) observaram que a exposição ao DEP levou a um aumento de 50% na peroxidação lipídica 18 horas após a exposição, conforme medido pela formação de MDA.

O aumento do estresse oxidativo induzido pela exposição a partículas tóxicas, como DEP, também está associado à liberação de citocinas pró-inflamatórias em ensaios clínicos e modelos experimentais de camundongos (Takano et al., 2002; Patel, Eo e Kwon 2011; Patel et al., 2010; Den Hartigh et al., 2010). Nossos achados corroboram com estudos experimentais (Zhao et al., 2009; Martin et al., 2010; Kodavanti et al., 2011) demonstraram que níveis aumentados de poluição do ar aumentam a liberação de radicais livres, notadamente espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, sistemicamente ou localmente em diferentes órgãos.

Após verificar que a exposição a partículas de diesel está relacionada com maior produção de oxidantes, verificou-se os efeitos do exercício físico sobre o sistema antioxidante. Para isso foi avaliado os níveis proteicos e/ou atividade de moléculas envolvidas na neutralização das espécies reativas, enzimas do sistema glutaciona, superóxido dismutase e catalase.

Quando comparamos os grupos exercício e não exercício, constatamos diferenças significativas na produção de antioxidantes apenas nas enzimas catalase e GSSG na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, no grupo de animais não exercitados. Como as principais enzimas antioxidantes incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx), que são ativadas normalmente durante o metabolismo celular (Hollander et al., 2000), a diminuição da atividade da SOD pode indicar que ela foi consumida como resultado do estresse oxidativo e o aumento da CAT e GSSG podem sugerir que o desenvolvimento do estresse oxidativo é seguido por uma reação adaptativa que equilibra a atividade potencialmente prejudicial das ERO pelos mecanismos de defesa antioxidante. Além disso, em situações normais a GSSG representa apenas uma pequena fração da glutatona total. A razão entre a glutatona oxidada e glutatona reduzida ou inverso (GSH/GSSG ou GSSG/GSH) é normalmente utilizada para estimar o estado redox dos sistemas biológicos (Barreiros e David, 2006). Nos resultados deste estudo também ficou evidenciado que na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ha uma possível modulação dos efeitos benéficos do exercício relacionados à resposta anti-inflamatória e antioxidante induzida pelo exercício.

Nossos achados corroboram com vários estudos realizados, tais como Vieira et al. (2012), que constataram que a prática regular e de longa duração de exercício aeróbico de baixa intensidade foi protetora dos efeitos da exposição a DEP pela inibição da produção pulmonar de ERO e óxido nítrico. Os autores relatam ainda que a DEP induziu um aumento significativo no número de células totais, neutrófilos, macrófagos e linfócitos no LBA e na densidade de células PMN no parênquima pulmonar. Essa resposta inflamatória induzida pela DEP também foi inibida pelo exercício aeróbico. Os resultados do estudo sugerem que a redução no estresse oxidativo é um evento primário ligado aos efeitos anti-inflamatórios do exercício a longo prazo.

Fisher e Bloomer (2009), destacam que qualquer condição aguda de aumento do consumo de oxigênio leva ao estresse oxidativo e conseqüentemente à produção de ERO. Assim, o aumento moderado e repetido das ERO causado pelo exercício resulta em uma resposta adaptativa com melhora do sistema de defesa antioxidante. Além disso, há uma alteração associada no balanço redox (equilíbrio entre oxidação e redução) que produz um ambiente redutor, resultando em um aumento nas defesas

antioxidantes. Esse mecanismo resulta em uma proteção adaptativa contra ERO durante as sessões subsequentes de exercícios.

Vieira et al. (2012) demonstraram que o exercício aeróbico de baixa intensidade resultou em diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias e diminuição dos níveis de estresse oxidativo e nitrosativo, bem como inibição da inflamação pulmonar e sistêmica. Estes resultados sugerem uma possível modulação dos efeitos benéficos do exercício através de vias anti-inflamatórias e antioxidantes. Resultados similares também foram encontrados em outros estudos que mostram que os efeitos benéficos do exercício podem estar diretamente relacionados à resposta anti-inflamatória e antioxidante induzida pelo exercício (Ji, 2008; Radak, Chung, Goto 2008; Silva et al., 2010).

Ávila et al. (2015) demonstraram que sessões de natação foram capazes de melhorar significativamente a defesa antioxidante em camundongos expostos à DEP por 10 dias, resultando em um aumento nos níveis de CAT, GSH-t e tióis não proteicos (NPSH), que são moléculas antioxidantes conhecidas nos homogenatos de pulmão, concluindo que os efeitos antioxidantes da natação podem reduzir o modelo de inflamação pulmonar induzida por DEP, sugerindo sua influência no balanço redox.

Em estudo realizado por Kooter et al. (2010) para avaliar os efeitos do MP no sistema respiratório de camundongos 4, 18, 24, 48 e 72 horas pós-exposição, os pesquisadores constataram que o efeito no sistema de defesa antioxidante precedeu uma inflamação local e uma resposta pró-coagulante local e sistêmica; às 18 horas, a razão GSH/GSSG diminuiu, e a atividade das enzimas antioxidantes GPx e SOD foi aumentada, os níveis de MDA aumentaram, às 24 horas. Observaram ainda que o aumento dos marcadores inflamatórios IL-6 e TNF- α só foi visto nos últimos pontos de tempo da investigação. Os autores desatacaram que esta última observação, juntamente com a ausência de influxo de PMN, sugere que há uma resposta inflamatória retardada, que pode ter seu máximo após 72 h. Os achados de Kooter et al. (2010) sugerem a exposição a partículas de diesel, resulta em uma resposta hierárquica ao estresse oxidativo, indicado inicialmente por uma defesa antioxidante entre 4 e 24 horas após a exposição e posteriormente por uma resposta inflamatória marcada por níveis aumentados de TNF- α e IL-6 entre 48 e 72 horas. Os autores concluíram ainda que diferentes estágios no estresse oxidativo não são afetados somente pela concentração de DEP, mas também pelo tempo após a exposição.

Uma vez observado que o exercício físico reduziu a produção de oxidantes ou não potencializou sua produção e que esses achados podem ter ocorridos devido a maior atividade das moléculas antioxidantes CAT e GSSG, foram analisados os níveis proteicos dos marcadores de inflamação TNF α , IL1 e IL6 em pulmão.

Diversos estudos apontam que a exposição ao material particulado proveniente de combustíveis fósseis ou não, estão diretamente relacionados ao aumento na produção de algumas citocinas pró-inflamatórias. Na sequência, enumeramos alguns estudos que possuem evidências suficientes que indicam efeitos deletério da exposição a partículas de diesel em animais e humanos.

Estudos realizados com animais evidenciam que a exposição a DEP induz uma resposta inflamatória no pulmão caracterizada pelo acúmulo de neutrófilos, monócitos, células dendríticas e células T (Provoost et al., 2012 e Provoost et al., 2016). O DEP induz a liberação sistêmica de IL-6, uma citocina considerada um biomarcador confiável do processo inflamatório em camundongos (Gimeno et al., 2011; Nemmar et al., 2010). A IL-6 tem sido particularmente associada à exposição ao diesel ou a DEP em roedores (Robertson et al., 2012; Conklin, Kong e Committee, 2015) e humanos (Krishnan et al., 2013). Aumentos de IL-6 sistêmica e TNF- α 24 horas após a exposição a DEP foram relatados em humanos (Tornqvist et al., 2007), animais (Robertson et al., 2012) e em intervalos de tempo menores que 24 horas (Nemmar e Inuwa, 2008). Kumar et al. (2017) destacam que dependendo do poluente, o TNF- α pode ativar diferentes vias de sinalização para induzir uma resposta inflamatória no pulmão.

Park et al. (2011) constataram que as concentrações das citocinas pró-inflamatórias, IL-1, TNF- α e IL-6, foram significativamente maiores em camundongos tratados com DEP do que nos controles; em particular, os animais tratados com DEP exibiram um aumento na concentração de TNF- α desde o dia 1 até o 14 dia após o tratamento. Similarmente, a concentração de IL-6 no fluido broncoalveolar de camundongos tratados com DEP foi de 2,7 vezes a dos camundongos controle no primeiro dia de exposição. Em estudos com animais, a exposição aguda e crônica a DEP foi relatada como associada a níveis elevados de TNF- α no tecido pulmonar (Hiramatsu et al., 2013, Nemmar et al., 2015), contudo sem fazer relação a animais exercitados e não exercitados.

Assim, após a caracterização do efeito deletério do DEP, analisamos homogeneizado pulmonar para avaliar os biomarcadores pró-inflamatórios TNF α , IL-1 e IL-6 e aferir se há diferença entre animais exercitados e não exercitados.

Comparando os grupos de animais exercitados e não exercitados, constatamos diferenças significativa somente nos níveis de IL-1. Os níveis de TNF α apresentaram diferença significativa somente quando comparamos as concentrações de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ no grupo sem exercício. Resultado similar ocorreu com IL-6, onde encontramos diferença significativa entre as concentrações de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ambas no grupo sem exercício.

Deste modo, nossos resultados corroboram com alguns estudos que atribuem ao exercício físico efeito protetor sobre a exposição ao MP. Silva-Renno et al. (2018), avaliaram os efeitos da exposição ao MP durante a realização de exercício aeróbico na inflamação sistêmica. Constataram que a exposição a MP_{2,5} e MP₁₀ aumentou as concentrações de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α as quais foram reduzidas pelo exercício aeróbico. Fashi, Agha Alinejad, Asilian Mahabadi (2015) demonstram que a exposição ao MP₁₀ proveniente de carvão aumentou a expressão gênica TLR4, NF- κ B e TNF- α no tecido pulmonar e que o exercício aeróbico diminuiu a expressão destas citocinas.

Ávila et al. (2015) mostraram que a natação de alta intensidade resultou em diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ , nos homogenatos de pulmão, enquanto os exercícios aumentaram os níveis de citocinas anti-inflamatórias, como IL-1 α e IL-10. Nimmo et al. (2013) destacam que as respostas inflamatórias ao exercício agudo e exercício regular/crônico são diferentes, pois o exercício agudo geralmente leva a inflamação, enquanto o exercício regular pode levar a inflamação de baixo grau devido aos efeitos adaptativos do músculo esquelético.

Este estudo é destoante de estudos prévios realizados devido a metodologia utilizada para exposição dos animais ao DEP. Optou-se pela simulação do ambiente real, onde os animais são expostos a DEP em suspensão enquanto que os demais estudos utilizam instilação. Também se optou por um tempo de duração maior, pois os animais foram expostos a DEP e exercitados durante 8 semanas. Segundo Zhang et al. (2018), a exposição a longo prazo à poluição do ar geralmente leva a um risco maior para a saúde do que a exposição aguda ou a curto prazo devido ao seu efeito cumulativo.

Após analisamos os biomarcadores pró-inflamatórios TNF α , IL-1 e IL-6 avaliou-se os níveis de AKT. A importância das vias de transdução de sinal intracelular, como a via PI3K / AKT / mTOR no crescimento, sobrevivência e proliferação celular, tem sido justificada nos últimos anos. A superativação de tais vias foi identificada em muitos tipos de câncer, incluindo o câncer de pulmão, e está fortemente correlacionada com o desenvolvimento e progressão tumoral, metástase, quimio e radorresistência (Sarris, Saif e Syrigos, 2012).

A AKT é a molécula central da via, sendo ativada após o recrutamento para a membrana plasmática por PIP3. Atua a jusante do PI3K para regular os processos celulares, incluindo a sobrevivência, proliferação e crescimento celular (Manning e Toker, 2017).

Em nossos achados, constatamos diferenças significativas nos animais expostos as concentrações de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de DEP quando comparadas ao grupo controle corroborando com estudo realizado por Huang et al. (2011), o qual demonstra que as frações de tamanhos diferentes de material particulado MP_{10-2.5}, MP_{2.5} e MP_{0.1} são capazes de induzir respostas de estresse oxidativo mediadas por Nrf2 em células epiteliais de vias aéreas humanas primárias. Cheng et al. (2010) descreveram que as vias MAPK e PI3K / Akt estão envolvidas na fosforilação de Nrf2 para facilitar a dissociação com Keap1 e translocação nuclear.

Deng et al. (2013) realizaram um estudo para avaliar se as vias p38 MAPK, ERK1/2 e PI3K estavam envolvidas na regulação da translocação de Nrf2 do citoplasma para o núcleo, descobrindo que a via foi ativada após exposição a MP_{2,5} em diferentes tempos após a exposição.

A Akt é uma serina/treonina quinase citosólica (Rane et al., 2003) que contribui para a inflamação e lesão pulmonar (Abraham 2003), promove a quimiotaxia para combater a infecção bacteriana (Abraham 2005) e é um mecanismo de adaptação pró-sobrevivência após o estresse (Hu et al. 2004). A Akt contribui para a inflamação, ativando o fator de transcrição pró-inflamatório NF- κ B desempenhando um papel central na sobrevivência, alterando o metabolismo celular e inibindo a apoptose (Newcomb et al., 2008; Amaravadi e Thompson, 2005). A regulação da Akt ocorre principalmente através da modificação pós-traducional (Amaravadi e Thompson 2005). A ativação prototípica da Akt ocorre através da ativação mediada pelo receptor da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K).

Ao avaliarmos Akt, não encontramos diferenças significativas quando comparamos os animais exercitados aos não exercitados. Encontramos diferenças

quando comparamos as concentrações de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ no grupo exercício, ficando evidente uma redução nos níveis de Akt conforme as concentrações foram aumentando.

Após analisamos a Akt foi avaliado índice e a frequência de dano em DNA. Está documentado previamente que um desequilíbrio entre a produção de ERO e a sua neutralização através das defesas antioxidantes levam ao quadro de estresse oxidativo. Perturbações neste equilíbrio redox levam ao aumento nas concentrações de ERO, que podem causar danos a todos os componentes celulares, incluindo proteínas, lipídeos e o DNA (Ceylan et al., 2006). DEP podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio, causar danos oxidativos ao DNA, devido a inalação ou instilação (Müller et al., 2004), desencadeados pela quebra e liberação dos componentes químicos de DEP solúveis nas células, o que induz a inflamação pulmonar e desequilíbrio redox (Park et al., 2011; Vieira et al., 2012; Maier et al., 2008).

Para avaliação do índice e a frequência de dano em DNA foram coletadas amostras de sangue na quarta e oitava semanas após o início do treinamento e exposição ao DEP. Nossos resultados revelaram diferenças significativas no índice e frequência de dano em DNA nas três diferentes concentrações de DEP, quando comparadas ao grupo controle, corroborando com achados de Moller et al. (2014) que mostram a exposição a diferentes concentrações de DEP causam danos ao DNA pulmonar, sugerindo ainda que o DEP induz danos ao DNA promovendo um ambiente de estresse oxidativo e inflamação.

Está amplamente documentado os benefícios do exercício físico para a saúde (Carlisle e Sharp, 2001; Johnsen et al., 2013; Giles e Koehle, 2014; Florian, 2016; Tainio et al., 2016) porém a atividade física intensa regular está associada a um aumento na produção de radicais livres que podem superar a capacidade do sistema antioxidante de manter a homeostase e levar ao dano celular (Fisher e Bloomer, 2009). Contudo, há evidências em alguns estudos em animais sugerindo que o exercício regular diminui o dano ao DNA e aumenta o reparo do DNA (Radak et al., 2002). Dos fatores modificáveis que podem proteger contra danos no DNA ou melhorar seu reparo, a atividade física é de particular interesse, pois níveis mais altos de atividade física estão associados a menor risco de várias doenças (Cash et al., 2013). Contudo, nossos resultados não constataram diferença significativa quando

comparado os grupos exercitados e não exercitados nas diferentes concentrações de DEP, tanto na frequência quanto no índice de dano em DNA.

Porém, uma evidência que merece destaque no presente estudo foi o aumento no índice e frequência de dano em DNA entre as duas coletas de sangue que foram realizadas. Com 4 semanas de intervalo entre a primeira e a segunda coleta, sendo a primeira realizada ao final da quarta semana de exposição e exercício e a segunda realizadas após a oitava semana de exposição e exercício, observamos aumentos médios superior a 50% na frequência de dano nas concentrações de 500, 1.000 e 2.000 μm^3 de DEP. Resultado similar foi encontrado no índice de dano em DNA, porém com variações ainda maiores. Conforme discutido anteriormente uma possível explicação para nossos achados está relacionada ao tempo de exposição ao poluente. Diversos estudos de instilação e inalação em animais são de exposição aguda ou de duração de até quatro semanas. Neste sentido, este estudo merece destaque pois ampliou o tempo de exercício físico e inalação ao poluente, o que aumentou o índice e frequência de dano em DNA. Costa et al. (2014), destacam que é importante observar os efeitos adversos do DEP em um curto intervalo de tempo após a exposição (efeito agudo) mas é necessário avaliar os efeitos da exposição cumulativa ao longo do tempo (efeito crônico). Assim, estudos sobre a exposição humana e em animais a poluentes atmosféricos devem abordar o impacto sobre a saúde de curto e longo prazo.

Posteriormente às análises de sangue procedemos à avaliação da frequência e o índice de dano no DNA em homogeneizados de pulmão. Constatamos diferenças significativas no índice e na frequência de dano no DNA nas três diferentes concentrações de DEP, quando comparadas ao grupo controle, resultados similares a Dybdahl et al. (2003), que constataram após a administração oral de DEP, um aumento significativo no nível de quebras da fita de DNA em pulmão de camundongos.

Müller et al. (2004) realizaram um estudo para avaliar marcadores de danos em DNA e mutações em pulmão de camundongos instilados por DEP. Constataram aumento significativo do dano em DNA medido por quebras na fita de DNA, e que a indução de danos no DNA pela exposição a DEP não aumentou a expressão dos genes de reparo OGG1 e ERCC1 no nível de mRNA. O estudo indicou ainda que o pulmão é um órgão alvo para danos no DNA primário após exposição oral ao DEP.

Uma possível explicação para nossos resultados está relacionada a inflamação crônica de baixo grau, que pode causar danos ao DNA através de um aumento

persistente das espécies reativas de oxigênio ERO, produzidas e liberadas por células imunes ativadas, pois, o estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre os sistemas de geração de radicais e de eliminação de radicais, levando ao comprometimento da membrana celular ou dano ao DNA (Yao e Rahman, 2011; Ovrevik et al., 2017). Porém, estudos que investigaram os mecanismos subjacentes aos benefícios do exercício físico regular (Radak et al., 2001; Mergener et al., 2009; Fogarty et al., 2011), sugerem que o exercício físico pode estar relacionado à menor produção de oxidantes, regulação positiva da capacidade antioxidante ou ainda maior atividade de reparo do DNA. Estudos prévios mostraram que o estresse oxidativo diminui após um período de exercício físico em diferentes tecidos e células animais (Lambertucci et al., 2006; Nakamoto et al., 2007) evidenciando que a geração baixa a moderada de ERO induzida pelo exercício físico regular pode ser benéfica, uma vez que induz uma regulação positiva de algumas enzimas antioxidantes. Soares et al., (2015) reforçam a associação entre maior atividade física diária e maior aptidão aeróbica com menores quebras na cadeia de DNA, postulando que o exercício pode causar um conjunto de adaptações que protegem a integridade do DNA.

Considerando que o exercício crônico aumenta a capacidade antioxidante, parece provável que se espere uma redução do dano ao DNA resultante do aumento na capacidade de reparo e capacidade antioxidante (Collins e Gaivao, 2007), contudo, no presente estudo, não ficou evidenciado diferenças significativas entre os grupos de animais exercitados e não exercitados nas diferentes concentrações.

6 CONCLUSÕES

Em conjunto, os nossos resultados indicam que a exposição a DEP induz a alterações da histoarquitetura pulmonar, estado inflamatório, estresse oxidativo e dano em DNA, sendo estas alterações dependentes das concentrações de material particulado no ambiente. O exercício físico parece exercer efeito anti-inflamatório em camundongos expostos à DEP, contudo mais estudos são necessários para melhor compreender os mecanismos envolvidos nos efeitos anti-inflamatórios do exercício físico e o papel das diferentes doses/concentrações de DEP.

REFERÊNCIAS

- Abe S., Takizawa H., Sugawara I., Kudoh S. Diesel exhaust (DE) - induced cytokine expression in human bronchial epithelial cells: a study with a new cell exposure system to freshly generated DE in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000; 22:296-303.
- Abbasi A, Vieira RP, Northoff H. Letter to the editor: The evidence of exercise-induced bronchoconstriction in endurance runners; genetic basis and gender differences. *Exerc Immunol Rev* 2015; 21: 186–188.
- Abraham E. Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med.* 2003; 31(4 Suppl): S195–199.
- Abraham E. Akt/protein kinase B. *Crit Care Med.* 2005; 33(12 Suppl): S420–422.
- Adar SD, Adamkiewicz G, Gold DR, Schwartz J, Coull BA, Suh H. Ambient and microenvironmental particles and exhaled nitric oxide before and after a group bus trip. *Environ Health Perspect.* 2007; 115:507-512.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Métodos Enzymol.* 1984; 105 : 121–126.
- Amaravadi R, Thompson CB. The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J Clin Invest.* 2005; 115(10):2618–2624.
- American Cancer Society (ACS). Disponível em: <<http://www.cancer.org>>. Acesso em: 20 agosto de 2017.
- Andersen ZJ, de Nazelle A, Mendez MA, Garcia-Aymerich J, Hertel O, Tjønneland A, Overvad K, Raaschou-Nielsen O, Nieuwenhuijsen MJ. A study of the combined effects of physical activity and air pollution on mortality in elderly urban residents: the Danish diet, cancer, and health cohort. *Environmental Health Perspectives.* 2015; n. 123, p. 557-563.
- Araujo JA, Barajas B, Kleinman M, Wang X, Bennett BJ, Gong KW, Navab M, Harkema J, Sioutas C, Lusic AJ, Nel AE. Ambient Particulate Pollutants in the Ultrafine Range Promote Early Atherosclerosis and Systemic Oxidative Stress. *Circ Res.* 2008; 102:589-596.
- Arlt VM, Sorg BL, Osborne M, Hewer A, Seidel A, Schmeiser HH et al. DNA adduct formation by the ubiquitous environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone and its metabolites in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300:107-114
- Ascensao A, Magalhaes J, Soares J, Oliveira J, Duarte JA. Exercise and cardiac oxidative stress. *Rev Port Cardiol.* 2003;22(5):651–678.
- Ávila LC, Bruggemann TR, Bobinski F, da Silva, MD, Oliveira RC, Martins DF, Mazzardo-Martins L, Duarte MM, de Souza L F, Dafre A, Vieira RP, Santos AR, Bonorino KC, Hizume Kunzler DC. Effects of High-Intensity Swimming on Lung

Inflammation and Oxidative Stress in a Murine Model of DEP-Induced Injury. *PloS one*. 2015; 10(9), e0137273.

Azqueta A, Collins AR. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol*. 2013;87(6):949-68.

Baird, C. *Química Ambiental*. Porto Alegre: Bookman, 2002.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 1987; 32:279-312.

Bargagli E, Olivieri C, Bennett D, Prasse A, Muller-Quernheim J, Rottoli P. Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: a review *Respir Med*. 2009; 103(9):1245-56.

Barreiros A, David JM. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Revista Química Nova*. 2006; 29(1): 113-123.

Beckerman BS, Jerrett M, Finkelstein M, Kanaroglou P, Brook JR, Arain MA, Sears MR, Stieb D, Balmes J, Chapman K. The association between chronic exposure to traffic-related air pollution and ischemic heart disease. *J. Toxicol. Environ Health A*. 2012; 75: 402–412.

Blair SN, Morris JN. Healthy hearts and the universal benefits of being physically active: physical activity and health. *Ann Epidemiol*. 2009; 19(4):253-256.

Bradford, MM; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; v. 72, p. 248-254.

Braga, B. Hespanhol I, Conejo JGL, Mierzwa JA, Barros MTL, Spencer M, Porto M, Nucci N, Juliano N, Eiger S. *Introdução à Engenharia Ambiental*. São Paulo: Prentice Hall, 2002.

Braun S, Appel LG, Schmal M. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movidas à diesel - a questão dos particulados. Estratégias atuais para a redução e controle das emissões e tendências futuras. *Quím. Nova* vol.27 no.3 São Paulo May/June 2003.

Brogna J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res*. 2001; May 15;61(10):3986-97.

Cançado JE, Braga A, Pereira LA, Arbex MA, Saldiva PH, Santos UP. Repercussões clínicas da exposição à poluição atmosférica. *J Bras Pneumol*. 2006; 32 (Supl 1):S5-S11.

Carlisle AJ, Sharp NCC. Exercise and outdoor ambient air pollution. *Br J Sports Med* 2001; 35:214-222.

Cash SW, Beresford SA, Vaughan TL, Heagerty PJ, Bernstein L, White E, Neuhauser, ML. Recent physical activity in relation to DNA damage and repair using the comet assay. *Journal of physical activity & health*, 2013; 11(4), 770-6.

Castanho, A. *A Determinação Quantitativa de Fontes de Material Particulado na Atmosfera da Cidade de São Paulo*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Física, Universidade de São Paulo, 1999.

Castro AHS, Araújo RS, Silva GMM. *Qualidade do ar - parâmetros de controle e efeitos na saúde humana: uma breve revisão* HOLOS, Ano 29, Vol. 5. 2013.

Cavalcanti, PMPS. *Modelo de Gestão da Qualidade do Ar – Abordagem Preventiva e Corretiva*. Tese de doutorado – UFRJ/COPPE/Programa de Planejamento Energético Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2010.

Cetesb. *Qualidade do ar no estado de São Paulo 2015*. São Paulo: CETESB, 2016.

Chiu HF, Yang CY. Air pollution and emergency room visits for arrhythmias: Are there potentially sensitive groups? *J. Toxicol. Environ. Health A*. 2009; 72: 817–823.

Cheng MF, Tsai SS, Yang CY. Air pollution and hospital admissions for myocardial infarction. *J. Toxicol. Environ. Health A* 2009. 72: 1135–1140.

Cheng MH, Chen CC, Chiu HF, Yang, CY. Fine particulate air pollution and hospital admissions for asthma: a case-crossover study in Taipei. *J Toxicol Environ Health A*. 2014;77(18):1075-83.

Cheng SE, Lee IT, Lin CC, Kou YR, Yang CM. Cigarette smoke particle-phase extract induces HO-1 expression in human tracheal smooth muscle cells: role of the c-Src/NADPH oxidase/MAPK/Nrf2 signaling pathway. *Free Radical Bio Med*. 2010 May 15;48(10):1410-22.

Collins AR, Gaivao I. DNA base excision repair as a biomarker in molecular epidemiology studies. *Mol Asp Med*. 2007; 28(3–4):307–322.

Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslová K, Vaughan N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen*. 1997; 30(2):139-46.

Comar, SR, Danchura HSM, Silva PH. Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2009; v. 31, n. 6, p. 431-6.

COMEAP for the DoH. *Asthma and air pollutants*. London: HMSO, 1995.

Comhair SA, Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; Aug; 283(2):L246-55.

Conklin DJ, Kong M, Committee HEIHR. Part 4. Assessment of plasma markers and cardiovascular responses in rats after chronic exposure to new-technology diesel

exhaust in the ACES bioassay. *Res Rep Health Eff Inst.* 2015; 184: 111–139. discussion 141-171.

Costa S, Ferreira J, Silveira C, Costa C, Lopes D, Relvas H, Borrego C, Roebeling P, Miranda AI, Teixeira JP. Integrating health on air quality assessment--review report on health risks of two major European outdoor air pollutants: PM and NO₂. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2014; 17 (6): 307-40.

Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 3 de 1990. Dispõe sobre padrões de qualidade do ar, previstos no PRONAR.

Corrêa, SM, Arbilla, G. Mercaptans emissions in diesel and biodiesel exhaust. *Atmospheric Environment.* 2008; 42, 6721.

Daigle CC, Chalupa DC, Gibb FR, Morrow PE, Oberdörster G, Utell MJ, Frampton MW. Ultrafine Particle Deposition in Humans During Rest and Exercise. *Inhalation Toxicology.* 2003; May;15(6):539-52.

Ceylan E, Kocyigit A, Gencer M, Aksoy N, Selek S. Increased DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease who had once smoked or been exposed to biomass. *Respir Med.* 2006; Jul;100(7):1270-6.

Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, Gallimore JR, Pepys MB. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ.* 2000 Jul 22; 321(7255):199-204.

Den Hartigh LJ, Lamé MW, Ham W, Kleeman MJ, Tablin F, Wilson DW. Endotoxin and polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient fine particulate matter from Fresno, California initiate human monocyte inflammatory responses mediated by reactive oxygen species. *Toxicol In Vitro.* 2010; 24: 1993–2002.

Deng, X., Rui, W., Zhang, F. et al. PM_{2.5} induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells. *Cell Biol Toxicol.* 2013; 29: 143.

Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, DuYn R, Newby DE, Mills N, et al. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol.* 2005; 2:10.

Dybdahl, M., L. Risom, P. Moller, H. Autrup, H. Wallin, U. Vogel, J. Bornholdt, B. Daneshvar, L.O. Dragsted, A. Weimann, H.E. Poulsen, S. Loft, DNA adduct formation and oxidative stress in colon and liver of Big Blue rats after dietary exposure to diesel particles. *Carcinogenesis.* 2003; 24:1759–1766.

EEA. *Air quality in Europe-2015 report.* Report, No 5/2015; 2015.

Fernando, S.; Hall, C.; Jha, S. NO_x reduction from biodiesel fuels. *Energy& Fuels,* v.20, p.376-382, 2006.

Fashi M, Agha Alinejad H, Asilian Mahabadi H. The Effect of Aerobic Exercise in Ambient Particulate Matter on Lung Tissue Inflammation and Lung Cancer. *Iran J Cancer Prev.* 2015; 8(3): e 2333.

Fisher WK, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med*. 2009; 8:1

Flohé L, Gunzler W. Ensaio de glutationa peroxidase. *Métodos Enzymol*. 1984; 105 (1): 114-121.

Florian, M. Acute respiratory response to traffic-related air pollution during physical activity performance. *Environment International*. 2016; v. 97, p. 45-55.

Fogarty MC, Hughes CM, Burke G, et al. Exercise-induced lipid peroxidation: implications for deoxyribonucleic acid damage and systemic free radical generation. *Environ Mol Mutagen*. 2011; 52(1):35–42.

Ghio AJ, Stonehuerner J, Dailey LA, Carter JD. Metals associated with both the water-soluble and insoluble fractions of an ambient air pollution particle catalyze an oxidative stress. *Inhal Toxicol*. 1999; Jan; 11(1):37-49.

Giles LV, Koehle MS. The health effects of exercising in air pollution. *Br J Sports Med*. 2014; 44(2):223-49.

Giles, LV, Carlsten C, Koehle, MS. The effect of pre-exercise diesel exhaust exposure on cycling performance and cardio-respiratory variables. *Inhal. Toxicol*. 2012. v. 24, pp. 783-789.

Gimeno D, Delclos GL, Ferrie JE, De Vogli R, Elovainio M, Marmot MG, Kivimäki M. Association of CRP and IL-6 with lung function in a middle-aged population initially free from self-reported respiratory problems: the Whitehall II study. *Eur J Epidemiol*. 2011; 26 (2): 135–44.

Giorgini P, Rubenfire M, Bard RL, Jackson EA, Ferri C, Brook RD. Air Pollution and Exercise: a review of the cardiovascular implications for health care professionals. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention*. 2016;36:84-95.

Golestani R, Razavian M, Ye Y, Zhang J, Jung JJ, Toczek J, Gona K, Kim HY, Elias JA, Lee CG, Homer RJ, Sadeghi MM. Matrix metalloproteinase-targeted imaging of lung inflammation and remodeling. *J Nucl Med*. 2016; Jul 28.

Goldsmith CA, Imrich A, Danaee H, Ning YY, Kobzik L. Analysis of air pollution particulate-mediated oxidant stress in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health A*. 1998; Aug 7; 54(7):529-45.

Guarieiro LLN, Vasconcellos PC, Solci MC. Poluentes Atmosféricos Provenientes da Queima de Combustíveis Fósseis e Biocombustíveis: Uma Breve Revisão. *Rev. Virtual Quim*. 2011, 3 (5), 434-445.

Greenberg N, Carel RS, Derazne E, Bibi H, Shpriz M, Tzur D, Portnov BA. Different effects of long-term exposures to SO₂ and NO₂ air pollutants on asthma severity in young adults. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2016; 2016; 79(8):342-51.

Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, Nascimento PC, Pomblum VJ, Garcia SC. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007; v.43, p.619-624.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford, 1989.

Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med*. 1991; 91 pp. 14s-22s.

Hamra GB, Guha N, Cohen A, Laden F, Raaschou-Nielsen O, Samet JM, Vineis P, Forastiere F, Saldiva P, Yorifuji T, Loomis D. Outdoor Particulate Matter Exposure and Lung Cancer: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Environmental Health Perspectives*. 2014;122(9):906-911.

Hazucha MJ, Bates DV, Bromberg PA. Mechanism of action of ozone on the human lung. *J Appl Physiol*. 1989; 67:1535–41.

Hiramatsu K, Azuma A, Kudoh S, Desaki M, Takizawa H, Sugawara I. Inhalation of diesel exhaust for three months affects major cytokine expression and induces bronchus-associated lymphoid tissue formation in murine lungs. *Exp Lung Res*. 2003 Dec; 29(8):607-22.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976; Jul;74(1):214-26.

Hoek G, Krishnan RM, Beelen R, Peters A, Ostro B, Brunekreef B, Kaufman JD. Long-term air pollution exposure and cardio-respiratory mortality: a review. *Environ. Health*, 2013. p. 12-43.

Hollander J, Bejma J, Ookawara T, Ohno H, Ji LL. Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific effect of age. *Mech. Ageing Dev*. 2000; 116(1): 33-45.

Horsburgh S, Robson-Ansley P, Adams R, Smith C. Exercise and inflammation-related epigenetic modifications: focus on DNA methylation. *Exerc Immunol Rev*. 2015; 21:26-41.

Hu P, Han Z, Couvillon AD, Exton JH. Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *J Biol Chem* 2004; 279(47):49420–49429.

Huang YC, Karoly ED, Dailey LA, Schmitt MT, Silbajoris R, Graff DW, Devlin RB. Comparison of gene expression profiles induced by coarse, fine, and ultrafine particulate matter. *J Toxicol Environ Health A*. 2011; 74:296–312.

IARC. Diesel and gasoline engine exhaust and some nitroarenes. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2014; 105:33–467.

Jacobs LS, de Geus B, Meeusen R, Degraeuwe B, Bernard A, Sughis M, Nemery B, Int Panis L. Subclinical responses in healthy cyclists briefly exposed to traffic-related air pollution: an intervention study. *Environ Health*. 2010; 9:64.

Jarjour S, Jerrett M, Westerdahl D, Nazelle A, Hanning C, Daly L, Lipsitt J, Balmes J. Cyclist route choice, traffic-related air pollution and lung function: a scripted exposure study. *Environmental Health*. 2013; 12:14.

Ji LL. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: role of redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44: 142–52.

Johnsen NF, Ekblond A, Thomsen BL, Overvad K, Tjønneland A. Leisure time physical activity and mortality. *Epidemiology*. 2013; v.24:717–725.

Kelly FJ, Fussell JC. Linking ambient particulate matter pollution effects with oxidative biology and immune responses. *Ann N Y Acad Sci*. 2015; 1340:84–94.

Kinnula, VL, Fattman, CL, Tan, RJ, Oury, T. Oxidative stress in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172, pp. 417-422.

Kodavanti UP, Thomas R, Ledbetter AD, Schladweiler MC, Shannahan JH, Wallenborn JG, Lund AK, Campen MJ, Butler EO, Gottipolu RR, Nyska A, Richards JE, Andrews D, Jaskot RH, McKee J, Kotha SR, Patel RB, Parinandi NL. Vascular and cardiac impairments in rats inhaling ozone and diesel exhaust particles. *Environ Health Perspect*. 2011; 119 (3): 312–8.

Kooter IM, Gerlofs-Nijland ME, Boere AJ, Leseman DL, Fokkens PH, Spronk HM, Frederix K, Ten Cate H, Knaapen AM, Vreman HJ, Cassee FR. Diesel engine exhaust initiates a sequence of pulmonary and cardiovascular effects in rats. *J Toxicol*. 2010; 2010:206057.

Krishnan RM, Sullivan JH, Carlsten C, Wilkerson HW, Beyer RP, Bammler T, Farin F, Peretz A, Kaufman JD. A randomized cross-over study of inhalation of diesel exhaust, hematological indices, and endothelial markers in humans. *Part Fibre Toxicol*. 2013; 10:7.

Kubesch N, de Nazelle A, Westerdahl D, Martinez D, Carrasco-Turigas G, Bouso L, Guerra S, Nieuwenhuijsen MJ. Respiratory and inflammatory responses to short-term exposure to traffic-related air pollution with and without moderate physical activity. *Occup Environ Med*. 2015; 72(4):284–293.

Kumar S, Joos G, Boon L, Tournoy K, Provoost S, Maes T. Role of tumor necrosis factor- α and its receptors in diesel exhaust particle-induced pulmonary inflammation. *Sci Rep*. 2017; 7(1):11508.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680-5.

Laks D, de Oliveira RC, de André PA, Macchione M, Lemos M, Faffe D, Saldiva PH, Zin WA. Composition of diesel particles influences acute pulmonary toxicity: an experimental study in mice. *Inhal Toxicol*. 2008; 20: 1037–1042.

Lambertucci RH, Levada-Pires AC, Rossoni LV, Curi R, Pithon-Curi TC. Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. *Mech Ageing Dev*. 2006; Dec 23.

Lebel CP, Ali SF, Mckee M, Bondy SC. Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1990; v.104, p.17-24.

Lauzon AM, Martin JG. Airway hyperresponsiveness; smooth muscle as the principal actor. *F1000Res*. 2016; 5:F1000 Faculty Rev-306.

Lee IM, Shiroma EJ, Lobelo F, Puska P, Blair SN, Katzmarzyk PT. Lancet Physical Activity Series Working Group. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet* 2012; 21;380(9838):219-229.

Leigh R, Ellis R, Wattie JN, Hirota JA, Matthaei KI, Foster PS, O'Byrne PM, Inman MD. Type 2 cytokines in the pathogenesis of sustained dysfunction and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 169 (7): 860–7

Li YG, Gao X. Epidemiologic studies of particulate matter and lung cancer. *Chin J Cancer*. 2014; 33(8):376-80.

Li N, Kim S, Wang M, Froines J, Sioutas C, Nel A. Use of a stratified oxidative stress model to study the biological effects of ambient concentrated and diesel exhaust particulate matter. *Inhal Toxicol*. 2002 May; 14(5):459-86.

Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC, Nel AE. Particulate air pollutants and asthma: a paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin Immunol*. 2003; 109:250-265.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193:265-75.

McCreanor J, Cullinan P, Nieuwenhuijsen MJ, Stewart-Evans J, Malliarou E, Jarup L, Harrington R, Svartengren M, Han I.K, Ohman-Strickland P, Chung K.F, Zhang J. Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma. *N Engl J Med*. 2007; 357:2348–2358.

Mckenzie DC. Respiratory physiology: adaptations to high-level exercise. *Br J Sports Med*. 2012; 46(6):381–384.

MacNee W, Donaldson K. Mechanism of lung injury caused by PM10 and ultrafine particles with special reference to COPD. *Eur Respir J Suppl*. 2003; May; 40():47s-51s.

Maier KL, Alessandrini F, Beck-Speier I, Hofer TP, Diabaté S, Bitterle E, Stöger T, Jakob T, Behrendt H, Horsch M, Beckers J, Ziesenis A, Hültner L, Frankenberger M, Krauss-Etschmann S, Schulz H. Health effects of ambient particulate matter- biological mechanisms and inflammatory responses to in vitro and in vivo particle exposures. *Inhal Toxicol.* 2008; 20: 319–337.

Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* 2017; v 169, 3, 20 April.

Martin S, Fernandez-Alanis E, Delfosse V, Evelson P, Yakisich JS, Saldiva PH, Tasat DR. Low doses of urban air particles from Buenos Aires promote oxidative stress and apoptosis in mice lungs. *Inhal Toxicol.* 2010; 22 (13): 1064–71.

Matt F, Cole-Hunter T, Donaire-Gonzalez D, Kubesch N, Martínez D, Carrasco-Turigas G, Nieuwenhuijsen M. Acute respiratory response to traffic-related air pollution during physical activity performance. *Environment International.* 2016; Dec; 97:45-55.

Mergener M, Martins MR, Antunes MV, et al. Oxidative stress and DNA damage in older adults that do exercises regularly. *Clin Biochem.* 2009; 42(16–17):1648–1653.

Mills NL, Donaldson K, Hadoke PW, Boon NA, MacNee W, Cassee FR, Sandström T, Blomberg A, Newby DE. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nature clinical practice cardiovascular medicine.* 2009, January vol 6 no 1.

Moller P, Danielsen PH, Karotki DG, Jantzen K, Roursgaard M, Klingberg H, Jensen DM, Christophersen DV, Hemmingsen JG, Cao Y, Loft S. Oxidative stress and inflammation generated DNA damage by exposure to air pollution particles. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2014; 762:133-166.

Morales MM, Pires-Neto RC, Inforsato N, Lanças T, da Silva LF, Saldiva PH, Mauad T, Carvalho CR, Amato MB, Dolhnikoff M. Small airway remodeling in acute respiratory distress syndrome: a study in autopsy lung tissue. *Crit Care.* 2011; 15 (1): R4.

Mota MP, Peixoto FM, Soares JF, Figueiredo PA, Leitão JC, Gaivão I, Duarte JA. Influence of aerobic fitness on age-related lymphocyte DNA damage in humans: relationship with mitochondria respiratory chain and hydrogen peroxide production. *Age (Dordr)* 2010; 32(3):337–346.

Müller AK, Farombi EO, Moller P, Autrup HN, Vogel U, Wallin H, Dragsted LO, Loft S, Binderup ML. DNA damage in lung after oral exposure to diesel exhaust particles in Big Blue rats. *Mutat Res.* 2004; Jun 4;550(1-2):123-32.

Nakamoto H, Kaneko T, Tahara S, Hayashi E, Naito H, Radak Z, Goto S. Regular exercise reduces 8-oxodG in the nuclear and mitochondrial DNA and modulates the DNA repair activity in the liver of old rats. *Exp Gerontol.* 2007; 42(4):287–295.

Nemmar A, Nemery B, Hoet PH, Vermeylen J, Hoylaerts MF. Pulmonary inflammation and thrombogenicity caused by diesel particles in hamsters: role of histamine. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168: 1366–1372.

Nemmar A, Al-Salam S, Yuvaraju P, Beegam S, Ali BH. Emodin mitigates diesel exhaust particles-induced increase in airway resistance, inflammation and oxidative stress in mice. *Respir Physiol Neurobiol*. 2015; Aug 15; 215:51-7.

Nemmar A, Al-Salam S, Zia S, Dhanasekaran S, Shudadevi M, Ali BH. Time-course effects of systemically administered diesel exhaust particles in rats. *Toxicol Lett*. 2010; 194 (3): 58–65.

Nemmar A, Inuwa IM. Diesel exhaust particles in blood trigger systemic and pulmonary morphological alterations. *Toxicol Lett*. 2008; 176: 20–30.

Nemmar A, Al-Maskari S, Ali BH, Al-Amri IS. Cardiovascular and lung inflammatory effects induced by systemically administered diesel exhaust particles in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 292: L664–L670.

Newcomb DC, Sajjan US, Nagarkar DR, Wang Q, Nanua S, Zhou Y, McHenry CL, Henrick KT, Tsai WC, Bentley JK, Lukacs NW, Johnston SL, Hershenson MB. Human rhinovirus 1B exposure induces PI 3-kinase-dependent airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; Vol. 177, No. 10 | May 15.

Nimmo M., Leggate M., Viana J., King J. The effect of physical activity on mediators of inflammation. *Diabetes Obes. Metabol*. 2013; 15 pp. 51-60.

Nordenhäll C, Pourazar J, Blomberg A, Levin JO, Sandström T, Adelroth E. Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: a study of time kinetics using induced sputum. *Eur Respir J*. 2000 Jun; 15(6):1046-51.

Oliveira BF, Chacra AP, Frauches TS, Vallochi Um, Hacon S. A Curated Review of Recent Literature of Biomarkers Used for Assessing Air Pollution Exposures and Effects in Humans, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 2014. 17:7-8, 369-410.

Ovrevik J, Refsnes M, Lag M, Brinchmann BC, Schwarze PE, Holme JA. Triggering Mechanisms and Inflammatory Effects of Combustion Exhaust Particles with Implication for Carcinogenesis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017; Sep;121 Suppl 3:55-62.

Ovrevik J, Refsnes M, Lag M, Holme JA, Schwarze PE. Activation of proinflammatory responses in cells of the airway mucosa by particulate matter: oxidant- and non-oxidant-mediated triggering mechanisms. *Biomolecules*. 2015; 5:1399–440.

Paciência I, Madureira J, Rufo J, Moreira A, Fernandes EO. A systematic review of evidence and implications of spatial and seasonal variations of volatile organic compounds (VOC) in indoor human environments. *J Toxicol Environ Saúde B Crit Rev*. 2016; 19 (2): 47-64.

Park EJ, Roh J, Kang MS, Kim SN, Kim Y, Choi S. Biological responses to diesel exhaust particles (DEPs) depend on the physicochemical properties of the DEPs. *PLoS ONE*. 2011; 6: 10

Pastva A, Estell K, Schoeb TR, Atkinson TP, Schwiebert LM. Aerobic exercise attenuates airway inflammatory responses in a mouse model of atopic asthma. *J Immunol*. 2004; 172(7):4520–6.

Patel MM, Chillrud SN, Correa JC, Hazi Y, Feinberg M, Kc D, Prakash S, Ross JM, Levy D, Kinney PL. Traffic-related particulate matter and acute respiratory symptoms among New York City area adolescents. *Environ Health Perspect*. 2010; 118: 1338–1343.

Patel H, Eo S, Kwon S. Effects of diesel particulate matters on inflammatory responses in static and dynamic culture of human alveolar epithelial cells. *Toxicol Lett*. 2011; 200: 124–131.

Penttinen P, Timonen KL, Tiittanen P, Mirme A, Ruuskanen J, Pekkanen J. Ultrafine particles in urban air and respiratory health among adult asthmatics. *Eur Respir J*. 2001; 17:428-35.

Petry A, Weitnauer M, Gorlach A. Receptor activation of NADPH oxidases. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 13:467–87.

Pinho RA, Silveira PC, Silva LA, Luiz Streck E, Dal-Pizzol F, F Moreira JC. N-acetylcysteine and deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. *Environ Res*. 2005; Nov;99(3):355-60.

Provoost S, De Grove KC, Fraser GL, Lannoy VJ, Tournoy KG, Brusselle GG, Maes T, Joos GF. Pro- and Anti-Inflammatory Role of ChemR23 Signaling in Pollutant-Induced Inflammatory Lung Responses. *J Immunol*. 2016; Feb 15; 196(4):1882-90.

Provoost S, Maes T, Joos GF, Tournoy KG. Monocyte-derived dendritic cell recruitment and allergic T(H)2 responses after exposure to diesel particles are CCR2 dependent. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; Feb; 129(2):483-91.

Querol X, Alastuey A, Reche C, Orio A, Pallares M, Reina F, Dieguez JJ, Mantilla E, Escudero M, Alonso L, Gangoiiti G, Millán M. On the origin of the highest ozone episodes in Spain. *Science of the Total Environment*. 2016; 572: 379–389.

Quitério S, Silva CRS, Arbilla G, Escaleira V. Metals in airborne particulate matter in the industrial. District of Santa Cruz, Rio de Janeiro. *Atmospheric Environment*. 2004; 321- 331.

Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44: 153–159.

Radak Z, Naito H, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Takahashi R, Cardozo-Pelaez F, Goto S. Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch*. 2002; Nov; 445(2):273–278.

Radak Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev*. 2001; 7:90–107.

Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc.* 2006; 1(6):3159-65.

Rahman I, Biswas, SK, Kode, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol.* 2006; 533 pp. 222-239.

Rane MJ, Pan Y, Singh S, Powell DW, Wu R, Cummins T, Chen Q, McLeish KR, Klein JB. Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J Biol Chem.* 2003; Jul 25;278(30):27828-35. Epub 2003 May 9.

Resende, F. *Poluição atmosférica por emissão de material particulado: avaliação e controle nos canteiros de obras de edifícios.* Dissertação de mestrado. USP. São Paulo: 2007.

Riediker M, Cascio WE, Griggs TR, Herbst MC, Bromberg PA, Neas L, Williams RW, Devlin RB. Particulate matter exposure in cars is associated with cardiovascular effects in healthy young men. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 169: 934-940.

Robertson S, Gray GA, Duffin R, McLean SG, Shaw CA, Hadoke PW, Newby DE, Miller MR. Diesel exhaust particulate induces pulmonary and systemic inflammation in rats without impairing endothelial function ex vivo or in vivo. *Part Fibre Toxicol*; 2012; 9:9.

Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol.* 2008; 3:99–126.

Rundell KW, Slee JB, Caviston R, Hollenbach AM. Decreased lung function after inhalation of ultrafine and fine particulate matter during exercise is related to decreased total nitrate in exhaled breath condensate. *Inhalation Toxicology.* 2008; 20(1):1–9.

Rundell K.W. Effect of air pollution on athlete health and performance. *Br J Sports Med.* 2012; 46(6):407–412.

Santana, E. et al. *Padrões de qualidade do ar: experiência comparada Brasil, EUA e União Europeia.* São Paulo: Instituto de Energia e Meio Ambiente, 2012.

Santana, SSM. *Emissões gasosas de combustão diesel e de biodiesel utilizando motor Euro V e sistema de pós-tratamento SCR em dinamômetro de bancada.* Dissertação de mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais. UFP, Curitiba: 2015.

Silva RA, Vieira RP, Duarte AC, Lopes FD, Perini A, Mauad T, Martins MA, Carvalho CR. Aerobic training reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. *Eur Respir J.* 2010; 35: 994–1002.

Silva-Renno A, Baldivia GC, Oliveira-Junior MC, Brandao-Rangel MAR, El-Mafarjeh E, Dolhnikoff M, Mauad T, Britto JM, Saldiva PHN, Oliveira LVF, Ligeiro-Oliveira AP, Graudenz GS, Vieira RP. Exercise Performed Concomitantly with Particulate Matter

Exposure Inhibits Lung Injury. *International journal of sports medicine*. 2018; 39 (02), 133-140.

Siu PM, Pei XM, Teng BT, Benzie IF, Ying M, Wong SH. Habitual exercise increases resistance of lymphocytes to oxidant-induced DNA damage by upregulating expression of antioxidant and DNA repairing enzymes. *Exp Physiol*. 2011;96(9):889–906.

Soares JP, Silva, AM, Oliveira, MM, Peixoto, F, Gaivão, I, Mota, MP. Effects of combined physical exercise training on DNA damage and repair capacity: role of oxidative stress changes. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 2015; 37(3), 9799.

Solomon A, Smyth E, Mitha N, Pitchford S, Vydyanath A, Luther PK et al. Induction of platelet aggregation after a direct physical interaction with diesel exhaust particles. *J Thromb Haemost*. 2013; 11: 325–334.

Sarris EG, Saif MW, Syrigos KN. The Biological Role of PI3K Pathway in Lung Cancer. *Pharmaceuticals*. 2012; 5(11):1236-1264.

Schelegle ES, Adams WC. Reduced exercise time in competitive simulations consequent to low level ozone exposure. *Med Sci Sports Exerc*. 1986; 18:408–14.

Scichilone N, Morici G, Zangla D, Chimenti L, Davì E, Reitano S, Paternò A, Santagata R, Toghias A, Bellia V, Bonsignore MR. Effects of Exercise Training on Airway Responsiveness and Airway Cells in Healthy Subjects. *Journal of Applied Physiology Published*. August. 2010; v.109 no. 2, p. 288-294.

Sharovsky R, Lam C, Jaf R. Temperature, air pollution, and mortality from myocardial infarction in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37,1651-1657.

Sharman JE, Stowasser M. Australian association for exercise and sports science position statement on exercise and hypertension. *Journal of Science and Medicine in Sport*. 2009; 12(2):252–257.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988; Mar;175(1):184-91.

Sinharay R, Gong J, Barratt B, Ohman-Strickland P, Ernst S, Kelly F, Zhang J, Collins P, Cullinan P, Chung KF. Respiratory and cardiovascular responses to walking down a traffic-polluted road compared with walking in a traffic-free area in participants aged 60 years and older with chronic lung or heart disease and age-matched healthy controls: a randomised, crossover study. 2017; *Lancet* doi.org/10.1016/ S0140-6736(17)32643-0.

Smyth E, Solomon A, Birrell MA, Smallwood MJ, Winyard PG, Tetley TD, Emerson M. Influence of inflammation and nitric oxide upon platelet aggregation following deposition of diesel exhaust particles in the airways. *Br J Pharmacol*. 2017;174(13):2130-2139.

Souza PS, Gonçalves ED, Pedroso GS, Farias HR, Junqueira SC, Marcon R, Tuon T, Cola M, Silveira PCL, Santos AR, Calixto JB, Souza CT, Pinho RA, Dutra RC. Physical Exercise Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting Peripheral Immune Response and Blood-Brain Barrier Disruption. *Mol Neurobiol.* 2017; Aug;54(6):4723-4737.

Stenfors N, Nordenhäll C, Salvi SS, Mudway I, Söderberg M, Blomberg A, Helleday R, Levin JO, Holgate ST, Kelly FJ, Frew AJ, Sandström T. Different airway inflammatory responses in asthmatic and healthy humans exposed to diesel. *Eur Respir J.* 2004 Jan; 23(1):82-6.

Stojić SS, Stanišić N, Stojić A, Šošarić A. Single and combined effects of air pollutants on circulatory and respiratory system-related mortality in Belgrade, Serbia. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A.* 2016; 79(1):17-27.

Strak M, Boogaard H, Meliefste K, Oldenwening M, Zuurbier M, Brunekreef B, Hoek G. Respiratory health effects of ultrafine and fine particle exposure in cyclists. *Occup Environ Med.* 2010; 67(2):118-24.

Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Sadakane K, Yoshino S, Yoshikawa T, Morita M. Diesel exhaust particles enhance lung injury related to bacterial endotoxin through expression of proinflammatory cytokines, chemokines, and intercellular adhesion molecule-1. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165: 1329–1335.

Tainio M, Nazelle AJ, Götschi T, Kahlmeier S, Rojas-Rueda D, Nieuwenhuijsen MJ, Sá TH, Kelly P, Woodcock J. Can air pollution negate the health benefits of cycling and walking? *Preventive Medicine.* 2016; 87 233–236.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu, J. C.; Sasaki, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35(3):206-21.

Tornqvist H, Mills NL, Gonzalez M, Miller MR, Robinson SD, Megson IL, Macnee W, Donaldson K, Söderberg S, Newby DE, Sandström T, Blomberg A. Persistent endothelial dysfunction in humans after diesel exhaust inhalation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176: 395–400.

U.S. Environmental Protection Agency. Integrated risk information system database for risk assessment. Washington, DC: U.S. EPA. 2012.

Valavanidis A, Fiotakis K, Vlachogianni T. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2008 Oct-Dec; 26(4):339-62.

Valença SS, Castro P, Pimenta WA, Lanzetti H, Silva SV, Barja-Fidalgo C, Koatz VL, Porto LC. Light cigarette smoke-induced emphysema and NFκB activation in mouse lung. *Int J Exp Pathol.* 2006; 87(5):373–381.

Van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T, Qui D, Vincent R, Hogg JC. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; Sep 1; 164(5):826-30.

Van Eeden SF, Hogg JC. Systemic inflammatory response induced by particulate matter air pollution: the importance of bone-marrow stimulation. *J Toxicol Environ Health A*. 2002; Oct 25; 65(20):1597-613.

Veras MM, Caldini EG, Dolhnikoff M, Saldiva PH. Air Pollution and Effects on Reproductive-System Functions Globally with Particular Emphasis on the Brazilian Population, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 2010; 13:1, 1-15.

Vieira RP, Toledo AC, Ferreira SC, Santos AB, Medeiros MC, Hage M, Mauad T, Martins Mde A, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Airway epithelium mediates the anti-inflammatory effects of exercise on asthma. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011; 175: 383–389.

Vieira RP, Toledo AC, Silva LB, Almeida FM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Santos AB, Rivero DH, Hizume DC, Lopes FD, Olivo CR, Castro-Faria-Neto HC, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Anti-inflammatory effects of aerobic exercise in mice exposed to air pollution. *Med Sci Sports Exerc*. 2012; 44: 1227–1234.

Volpino P, Tomei F, La Valle C, Tomao E, Rosati MV, Ciarrocca M, De Sio S, Cangemi B, Vigliarolo R, Fedele F. Respiratory and cardiovascular function at rest and during exercise testing in a healthy working population: effects of outdoor traffic air pollution. *Occupational Medicine*. 2004; 54:475–482.

Yao H, Rahman I. Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011; 254:72-85.

Xu Y, Barregard L, Nielsen J, Gudmundsson A, Wierzbicka A, Axmon A, Jönsson BA, Karedal M, Albin M. Effects of diesel exposure on lung function and inflammation biomarkers from airway and peripheral blood of healthy volunteers in a chamber study. *Part Fibre Toxicol*. 2013; 10: 60.

Weichenthal S, Hatzopoulou M, Goldberg MS. Exposure to traffic related air pollution during physical activity and acute changes in blood pressure, autonomic and microvascular function in women: a cross-over study. *Part Fibre Toxicol*. 2014; 9;11-70.

West KA, Brognard J, Clark AS, Linnoila IR, Yang X, Swain SM, Harris C, Belinsky S, Dennis PA. Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J Clin Invest*. 2003; 111(1):81–90.

Wojtala A, Bonora M, Malinska D, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR. Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. *Methods Enzymol*. 2014;542:243-62.

Wong CM, Ou CQ, Thach TQ, Chau YK, Chan KP, Ho SY, Chung RY, Lam TH, Hedley AJ. Does regular exercise protect against air pollution-associated mortality? *Prev Med.* 2007; 44:386–392.

World Health Organization. *Health Aspects of Air Pollution with Particulate Matter, Ozone and Nitrogen Dioxide.* WHO, 2003.

World Health Organization. *Air quality guidelines global update - Report on a Working Group meeting.* WHO, 2005.

World Health Organization. *Air pollution levels rising in many of the world's poorest cities.* WHO, 2016.

Zhang Z, Hoek G, Chang LY, Chan TC, Guo C, Chuang YC, Chan J, Lin C, Jiang WK, Guo Y, Vermeulen R, Yeoh EK, Tam T, Lau AKH, Griffiths S, Lao XQ. Particulate matter air pollution, physical activity and systemic inflammation in Taiwanese adults. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 2018; 221: 41-47.

Zhao H, Ma JK, Barger MW, Mercer RR, Millecchia L. Reactive oxygen species- and nitric oxide-mediated lung inflammation and mitochondrial dysfunction in wild-type and iNOS-deficient mice exposed to diesel exhaust particles. *J Toxicol Environ Health A.* 2009; 72: 560–570.

APENDICES

APENDICE A

Quadro 1 – Registro da Concentração de PM 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

Dia	PM1 [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	PM2,5 [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	PM4 [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	PM10 [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	TOTAL [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
27/mar	0,493	0,493	0,493	0,494	0,496
28/mar	0,493	0,493	0,494	0,495	0,498
29/mar	0,490	0,490	0,490	0,491	0,492
30/mar	0,508	0,508	0,508	0,509	0,511
31/mar	0,506	0,506	0,506	0,507	0,509
03/abr	0,523	0,523	0,523	0,524	0,525
04/abr	0,470	0,470	0,471	0,471	0,473
05/abr	0,523	0,524	0,524	0,525	0,527
06/abr	0,518	0,518	0,519	0,519	0,520
07/abr	0,510	0,510	0,510	0,510	0,511
10/abr	0,519	0,519	0,519	0,520	0,520
11/abr	0,521	0,521	0,521	0,522	0,523
12/abr	0,502	0,503	0,503	0,505	0,508
13/abr	0,501	0,502	0,502	0,503	0,505
14/abr	0,499	0,500	0,501	0,503	0,505
17/abr	0,517	0,518	0,518	0,518	0,519
18/abr	0,521	0,521	0,521	0,522	0,522
19/abr	0,500	0,500	0,501	0,501	0,503
20/abr	0,501	0,501	0,502	0,502	0,503
21/abr	0,505	0,505	0,505	0,506	0,506
24/abr	0,499	0,500	0,501	0,503	0,505
25/abr	0,525	0,525	0,525	0,525	0,526
26/abr	0,508	0,508	0,508	0,509	0,511
27/abr	0,499	0,499	0,500	0,502	0,506
28/abr	0,538	0,539	0,539	0,540	0,542
01/mai	0,486	0,486	0,487	0,487	0,488
02/mai	0,506	0,507	0,509	0,512	0,514
03/mai	0,495	0,496	0,497	0,499	0,500
04/mai	0,491	0,492	0,492	0,493	0,494
05/mai	0,499	0,500	0,500	0,500	0,501
08/mai	0,481	0,481	0,481	0,482	0,483
09/mai	0,478	0,478	0,478	0,479	0,480
10/mai	0,497	0,498	0,498	0,499	0,500
11/mai	0,528	0,529	0,530	0,532	0,537
12/mai	0,490	0,491	0,492	0,494	0,497
15/mai	0,508	0,508	0,508	0,509	0,511
16/mai	0,493	0,493	0,494	0,495	0,497
17/mai	0,497	0,498	0,498	0,499	0,500

18/mai	0,500	0,501	0,501	0,502	0,502
19/mai	0,515	0,515	0,515	0,516	0,517
Média	0,504	0,504	0,505	0,506	0,507

APENDICE B

Quadro 2 – Registro da Concentração de PM 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

Dia	PM1 [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	PM2,5 [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	PM4 [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	PM10 [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	TOTAL [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
27/mar	0,996	0,997	0,997	0,998	0,999
28/mar	0,969	0,969	0,970	0,970	0,972
29/mar	0,986	0,987	0,987	0,988	0,989
30/mar	0,940	0,941	0,941	0,942	0,945
31/mar	0,889	0,890	0,890	0,891	0,893
03/abr	0,813	0,814	0,814	0,814	0,815
04/abr	0,875	0,875	0,876	0,876	0,877
05/abr	1,046	1,047	1,047	1,048	1,049
06/abr	1,020	1,020	1,020	1,021	1,022
07/abr	1,025	1,025	1,025	1,025	1,026
10/abr	1,081	1,081	1,081	1,081	1,082
11/abr	1,027	1,028	1,028	1,029	1,030
12/abr	1,021	1,022	1,023	1,025	1,029
13/abr	1,060	1,062	1,062	1,064	1,067
14/abr	1,020	1,020	1,020	1,021	1,022
17/abr	1,041	1,041	1,042	1,043	1,048
18/abr	1,048	1,048	1,049	1,049	1,050
19/abr	1,030	1,031	1,032	1,033	1,035
20/abr	1,068	1,069	1,069	1,069	1,070
21/abr	1,159	1,159	1,159	1,160	1,160
24/abr	1,045	1,045	1,046	1,046	1,048
25/abr	0,975	0,975	0,976	0,976	0,977
26/abr	0,984	0,984	0,985	0,986	0,990
27/abr	1,019	1,019	1,020	1,022	1,027
28/abr	1,035	1,036	1,036	1,038	1,040
01/mai	1,042	1,043	1,043	1,044	1,044
02/mai	0,925	0,926	0,927	0,930	0,932
03/mai	0,840	0,841	0,841	0,842	0,843
04/mai	0,922	0,923	0,924	0,925	0,926
05/mai	0,865	0,865	0,865	0,866	0,867
08/mai	1,040	1,041	1,041	1,041	1,042
09/mai	1,049	1,049	1,050	1,050	1,050
10/mai	1,070	1,071	1,071	1,072	1,073
11/mai	1,015	1,015	1,016	1,019	1,027
12/mai	1,019	1,020	1,020	1,022	1,023
15/mai	1,055	1,056	1,056	1,057	1,059
16/mai	1,058	1,059	1,059	1,060	1,062
17/mai	1,062	1,062	1,063	1,064	1,065

18/mai	1,070	1,071	1,071	1,072	1,073
19/mai	1,009	1,010	1,010	1,012	1,014
Média	1,005	1,006	1,006	1,007	1,009

APENDICE C

Quadro 3 – Registro da Concentração de PM 2.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

Dia	PM1 [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	PM2,5 [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	PM4 [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	PM10 [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	TOTAL [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
27/mar	1,827	1,828	1,829	1,831	1,833
28/mar	1,857	1,858	1,858	1,859	1,861
29/mar	1,837	1,838	1,838	1,838	1,840
30/mar	1,909	1,911	1,912	1,914	1,916
31/mar	1,418	1,419	1,419	1,420	1,422
03/abr	1,601	1,601	1,601	1,602	1,603
04/abr	1,706	1,706	1,706	1,707	1,708
05/abr	1,891	1,892	1,892	1,893	1,895
06/abr	1,914	1,915	1,915	1,916	1,916
07/abr	1,948	1,948	1,948	1,949	1,950
10/abr	1,770	1,771	1,772	1,772	1,774
11/abr	1,702	1,703	1,703	1,704	1,705
12/abr	1,959	1,960	1,960	1,963	1,966
13/abr	1,976	1,977	1,978	1,979	1,980
14/abr	1,935	1,936	1,936	1,937	1,939
17/abr	1,923	1,923	1,924	1,924	1,926
18/abr	1,822	1,823	1,823	1,824	1,826
19/abr	1,929	1,930	1,930	1,933	1,936
20/abr	1,894	1,895	1,896	1,898	1,900
21/abr	1,903	1,903	1,903	1,904	1,905
24/abr	1,937	1,938	1,938	1,940	1,942
25/abr	1,787	1,788	1,788	1,788	1,788
26/abr	1,452	1,453	1,454	1,459	1,465
27/abr	1,818	1,819	1,820	1,822	1,826
28/abr	1,975	1,976	1,977	1,978	1,981
01/mai	1,777	1,777	1,777	1,778	1,779
02/mai	1,020	1,021	1,022	1,024	1,025
03/mai	1,716	1,717	1,718	1,719	1,720
04/mai	1,415	1,421	1,422	1,422	1,423
05/mai	1,860	1,861	1,861	1,861	1,862
08/mai	1,786	1,786	1,786	1,787	1,788
09/mai	1,791	1,791	1,792	1,792	1,793
10/mai	1,936	1,936	1,937	1,938	1,939
11/mai	1,831	1,833	1,834	1,837	1,841
12/mai	1,834	1,835	1,835	1,837	1,839
15/mai	1,936	1,936	1,937	1,938	1,939
16/mai	1,916	1,917	1,917	1,919	1,920
17/mai	1,928	1,929	1,929	1,930	1,931

18/mai	1,935	1,936	1,936	1,937	1,939
19/mai	1,962	1,963	1,964	1,964	1,965
Média	1,808	1,809	1,810	1,811	1,813

ANEXOS

ANEXO A

Parecer da comissão de ética com animais



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do exercício no metabolismo oxidativo, inflamação e marcadores de estresse oxidativo muscular de animais expostos ao modelo de poluição ambiental.", registrada com o protocolo nº 002/2016-2, sob a responsabilidade de Ricardo Aurino de Pinho, junto à equipe: Renata Tiscoski Nesi, Emerson Antonio Brancher, Stella Maria Spessatto Brescianini, Helen Rebelo Sorato, Fernanda Tavares Pereira - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 09/08/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2016 a 20/12/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico swiss
Nº de animais	80
Peso/idade	25-35g / 2 meses
Sexo	Masculino
Origem	Biotério da Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: "Effect of exercise on oxidative metabolism, inflammation and oxidative stress markers in muscle of animals exposed to environmental pollution model".


Protocol number: 002/2016-2

Principal Investigator: Ricardo Aurino de Pinho

Researchers: Renata Tiscoski Nesi, Emerson Antonio Brancher, Stella Maria Spessatto Brescianini, Helen Rebelo Sorato, Fernanda Tavares Pereira.

The project was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 09 de agosto de 2016.


Jairo José Zoche
Coordenador da CEUA