UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Poluição atmosférica e exercício aeróbio: efeitos da duração e intensidade sobre
o sistema cardiorrespiratório, perfil inflamatório e metaboloma

LEONARDO ALVES PASQUA

São Paulo

2017

LEONARDO ALVES PASQUA

Poluição atmosférica e exercício aeróbio: efeitos da duração e intensidade sobre o sistema cardiorrespiratório, perfil inflamatório e metaboloma

Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo como requisito parcial para obtenção do título de doutor em ciências.

Programa: Educação Física

Área de concentração: Estudos Biodinâmicos da Educação Física e Esporte

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Cássio de Moraes Bertuzzi

São Paulo

2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: PASQUA, Leonardo Alves

Título: Poluição atmosférica e exercício aeróbio: efeitos da duração e intensidade sobre o sistema cardiorrespiratório, perfil inflamatório e metaboloma.

Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

A Deus, por criar o caminho. A meu pai e minha mãe, por me colocarem e manterem na caminhada. Ao meu irmão e cunhada, por andarem comigo. Aos meus sobrinhos, por fazerem a caminhada mais leve. À minha namorada, por me dar a mão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, Jesus e todos que nos acompanham e permitem nossos avanços durante a vida. Agradeço ainda pela presença de todas as pessoas citadas nesses agradecimentos em minha vida, e por todas as outras que, por um simples acaso, esqueci de mencionar, mas que também têm sua contribuição.

Ao meu Pai e à minha Mãe. Devo exatamente tudo o que já fiz a vocês. Jamais poderia ter escolhido pais melhores, mais amorosos, amigos, companheiros, engraçados, gente boa, parceiros e tudo mais de bom que poderia existir em duas pessoas que sempre estarão comigo a vida inteira. Admiro tantos pontos em vocês que nem consigo citar aqui. Obrigado por me ensinarem tantas coisas. Só posso agradecer por, mesmo parecendo que estamos longe, estarem sempre ao meu lado. Repito o que escrevi na minha dissertação: nunca vou conseguir agradecer o suficiente. Mas, **MUITO OBRIGADO!** Amo vocês! E deixo aqui registrado: vou trazê-los pra perto de mim!

Ao meu irmão. Nunca poderia pensar em outro melhor pra mim. Se você soubesse o quanto já me espelhei em você, tenho certeza que ficaria feliz. Obrigado por me ensinar tanto. Neária, minha cunhada, acabou se tornando uma irmã. Obrigado por formar, junto com meu irmão, essa família linda. E agora sim! Tá na hora de falar desses moleques. Meus dois sobrinhos! Tenho tantos apelidos pra colocar aqui, mas vou chamá-los de Ryan e Enzo mesmo. Nada como achar que você tem um monte de coisa pra fazer e ouvir um grito: “Tio, vamos brincar?”. Essa é aquela hora que aquele menino de uns 10 anos que mora aqui dentro fala mais alto, você larga tudo e vai brincar. Se suja, passa a tarde e depois tem que ficar acordado até mais tarde pra terminar o que ia fazer. Valeu a pena! Sempre! Faria e farei de novo! Brincar com esses dois todos esses anos sempre deixou tudo mais leve, mais engraçado. Não tem preço que pague isso! Acho que é por isso que eles amam tanto o tio! O tio também ama vocês, criaturas!

À Mayara, minha eterna namorada, minha parceira, minha dupla. Você já passou de ser importante faz tempo. Você é quem fez um quartinho parecer uma mansão. Você tornou todo o processo muito mais leve. Deixa a vida mais leve. Obrigado por me ajudar a aprender mais e querer mais. Você tem uma grande parcela nas minhas escolhas. Espero estar seguindo no caminho certo, porque você vem comigo! Obrigado por toda a ajuda nesse projeto. Sem você, eu não teria conseguido como foi. Tenho certeza que estaremos sempre juntos. Sempre! Juntos! Te amo minha FloR!

Ao meu sogro Manoel e minha sogra Ana, que me acolheram com tanto carinho nessa nova fase em Maceió. À minha cunhada Maryana e meu cunhado Matheus, que cederam espaço na sua casa para essa fase inicial e facilitaram bastante essa mudança de vida. Eu sei que a vida de vocês ficou muito melhor comigo, mas muito obrigado!

Agradeço às minhas tias Tereza e Zezé, em especial, por todo o carinho que sempre tiveram com a gente!

Agradeço a todos os amigos do GEDAE, do LADESP e da EEFE que estiveram presentes nesse processo: Salomão, Marcos, Renata, Beto, Rogério, Carlos Rafaell, João, Arthur, Ricardo, Patrícia, Kleiner, Úrsula, Valéria, Fabiano, Ingrid, Lucas, Amanda e Jhonny. Obrigado por toda as horas de laboratório, coletas, café, risadas, encrencas, etc. Vocês também ajudaram muito no processo. Pelo menos ficou mais divertido! Em especial, agradeço ao Ramon! Chegou todo mineiro no laboratório e logo já teve seu lugar! Você me ajudou demais nesse processo do doutorado. Não sabe quanto. Obrigado pelas correrias, pelas reuniões, discussões, análises e tudo mais. Obrigado de verdade! Sua colaboração foi importantíssima pra que esse trabalho tivesse andamento. E pára com essa história de que você ajuda porque tem benefícios. Você é gente boa mesmo, apesar de não parecer. Agradeço ao ÉÉdson por toda a ajuda e conselhos durante todo o processo, desde os primeiros dias que entrei no LADESP. Valeu por tudo japonês!! Agradeço ao Felipe, por toda a ajuda quando precisamos no laboratório, e a todos os residentes que passaram por lá nesse período. Aos voluntários, que compareceram às sessões com tanta boa vontade e permitiram a realização do estudo: Ricardo, Fabian, Drews, Sing, Ramon, Lucas, João, Manoel e Kleiner.

Ao meu grande amigo Claudião. Devido às atribuições, nos vemos cada vez menos. Mas com certeza será um amigo pra vida inteira! Valeu!

A toda a equipe da secretaria de pós graduação que atuou no período da minha pós: Ilza, Márcio, Mari, Maria e Paulo, pela imensa competência, paciência e disponibilidade em sempre ajudar! Todos os funcionários da EEFE que sempre encontrava diariamente pela EEFE e que sempre são tão simpáticos: Jair (agora chef), Hudson, Reginaldo, Paulão, Nascimento, Marcão, Ricardo, Bahia, Soninha, Glória, Vicente, Janildo, Lúcia, Marcelina, Luizão, Júlio, Cícero, Shirley.

À turma 77B de medicina da UFAL, pelos bons momentos nesse primeiro ano de uma nova jornada.

Ao prof. Marco Martins, que comprou a ideia e tanto colaborou com o início e o desenvolvimento do projeto. Sua colaboração foi essencial. Obrigado!

À Monique e à Paulinha, do Laboratório de Oftalmologia da FMUSP. Sabia que poderia encontrar portas abertas para trabalhar no laboratório de vocês, mas não tanto. Muito obrigado mesmo por sempre disponibilizarem o laboratório e equipamentos, assim como o tempo de vocês para nos ajudarem, de uma forma tão empática. Foi determinante para a realização do trabalho. Muito obrigado!

Ao prof. Paulo Saldiva, por autorizar a utilização do contêiner e a realização do estudo com os equipamentos necessários. À prof. Mônica Marquezini, por toda a disponibilidade em ajudar, principalmente nas questões administrativas e para conseguir os meios para algumas análises que fizemos. Sua colaboração foi muito importante. Ao Paulo Afonso, pela ajuda também no início das coletas na FMUSP. Obrigado!

Ao prof. Adriano, por praticamente me co-orientar durante todo o processo de pós-graduação. Em dezembro, em Maceió, pude ver o quanto realizou um trabalho significativo. Parabéns e obrigado! Ao prof. Gustavo, por acompanhar também boa parte do processo e sempre estar pronto a dar boas sugestões de um jeito tão simpático. Obrigado!

À CAPES pela bolsa concedida que me permitiu conduzir com mais tranquilidade o doutorado. Ao CNPEM e ao LNBio, que, com portas abertas, nos permitiram realizar as análises de metabolômica. Particularmente, ao prof. Maurício Sforça, pela enorme boa vontade em nos auxiliar a qualquer momento.

Por fim, guardo um agradecimento especial ao meu orientador, prof. Rômulo Bertuzzi. Desde o final da graduação, comecei a trabalhar no LADESP sob sua orientação. Desde lá, em 2008, pude perceber ao longo do tempo, o que também foi falado em outra Tese: você não orienta seus alunos apenas academicamente. E o fato de se importar também com o lado pessoal o faz um orientador ainda melhor. Desde sempre, concordo com hierarquias nas quais os superiores realmente possuam características que justifiquem sua posição. Posso dizer, com segurança, que isso tornou muito tranquilo ser seu orientando. Durante todo o tempo, pude aprender muito, e me ensinou muito como pessoa em dois momentos nos quais você tinha tudo pra ser completamente contrário às minhas decisões, mas me apoiou. Muito obrigado por isso!

Sempre procurei a genialidade em meu cérebro. Segui inocentemente o egoísmo do sistema nervoso, até perceber na simplicidade das batidas do coração o maior reflexo da grandeza, da audácia, do medo e da coragem. Agora o guia é outro. E este não calcula, não mede e não prevê. Apenas sente.

L.A.P.

RESUMO

PASQUA, L. A. **Poluição atmosférica e exercício aeróbico: efeitos da duração e intensidade sobre o sistema cardiorrespiratório, perfil inflamatório e metaboloma.**

2017. Tese (Doutorado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O objetivo da presente Tese de Doutorado foi analisar o impacto do exercício realizado em ambiente poluído sobre parâmetros cardiorrespiratórios, inflamação e metaboloma. Para isso, foi dividida em dois estudos, com o objetivo de analisar: a influência da duração (estudo 1) e da intensidade (estudo 2) do exercício sobre parâmetros cardiovasculares, de inflamação e o metaboloma. Foram recrutados 10 indivíduos fisicamente ativos do sexo masculino, que foram submetidos aos seguintes testes: a) teste progressivo até a exaustão voluntária; b) dois testes de carga constante no $\Delta 25$ da diferença entre o limiar ventilatório (LV) e o ponto de compensação respiratória (PCR), com duração de 90 minutos, sendo um no ambiente limpo e um no poluído (estudo 1) e; c) quatro testes de cargas constantes com 30 minutos de duração, sendo dois no $\Delta 25$ e dois no $\Delta 75$ da diferença entre o LV e o PCR, também em ambiente limpo e poluído. No estudo 1, foi observado um aumento na pressão arterial sistólica ($4,0 \pm 0,7$ mmHg) e diastólica ($6,1 \pm 0,5$ mmHg) após os 90 minutos de exercício em ambiente poluído, ao contrário do observado no ambiente limpo ($-6,2 \pm 0,8$ mmHg e $-1,3 \pm 0,5$ mmHg, respectivamente). Também após 90 minutos de exercício, foi observado aumento de IL-6 ($+37\%$; $p = 0,047$) e VEGF ($+257\%$; $p = 0,026$) e diminuição de IL-10 (-34% ; $p = 0,061$) no ambiente poluído em relação ao limpo. Por sua vez, o metaboloma mostrou alterações que foram mantidas ao longo do tempo, assim como alterações tempo-dependentes, capazes de sugerir que a duração do exercício é um fator importante a ser considerado em ambientes com altos índices de poluição atmosférica. Não houve diferença nas demais variáveis analisadas. A intensidade de exercício não mostrou alteração significativa em nenhum dos parâmetros analisados. É possível que a menor duração de exercício seja responsável por essa ausência de respostas específicas ao exercício em ambiente poluído. Por sua vez, o metaboloma apontou vias diferentemente afetadas no ambiente poluído quando o exercício foi realizado em alta intensidade, sugerindo que a intensidade pode ser um fator importante, porém, em maiores durações de exercício do que a utilizada no presente trabalho. Em conclusão, nossos resultados sugerem que quando o exercício é realizado em ambiente poluído, maiores durações são capazes de produzir respostas mais exacerbadas à inalação de poluentes, como aumento da pressão arterial e da inflamação, assim como diferentes alterações no metaboloma. Por outro lado, a intensidade do exercício não pareceu influenciar significativamente as respostas biológicas ao ambiente poluído, ao menos nas condições testadas.

Palavras-chave: poluição do ar; exercício; saúde; inflamação; metabolômica.

ABSTRACT

PASQUA, L. A. **Air pollution and aerobic exercise: effects of exercise duration and intensity on the cardiorespiratory system, inflammatory profile and metabolome.** 2017.

Thesis (Doctorate degree) – School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, São Paulo, 2017.

The aim of the present Thesis was to analyze the impact of exercise in polluted ambient on cardiorespiratory parameters, inflammation and metabolome. For this, it was divided in two studies, aiming to analyze: the influence of exercise duration (study 1) and exercise intensity (study 2) on cardiovascular parameters, inflammation and the metabolome. 10 healthy physical active male performed the following tests: a) maximal incremental test; b) two constant load tests at the $\Delta 25$ of the difference between ventilatory threshold (VT) and respiratory compensation point (RCP), with 90 minutes in duration, at clean and polluted conditions (study 1) and; c) four constant load tests with 30 minutes in duration, with two at $\Delta 25$ and two at $\Delta 75$ of the difference between VT and RCP, also at clean and polluted conditions. In the study 1, it was observed an increase in systolic (4.0 ± 0.7 mmHg) and diastolic (6.1 ± 0.5 mmHg) arterial pressure after 90 minutes of exercise at polluted condition, unlike the observed in clean condition (-6.2 ± 0.8 mmHg e -1.3 ± 0.5 mmHg, respectively). Also after 90 minutes of exercise, it were observed increases in IL-6 (+37%; $p = 0.047$) and VEGF (+257%; $p = 0.026$), and a decrease in IL-10 (-34%; $p = 0.061$) in the polluted related to clean condition. In turn, metabolome showed alterations which have been maintained over time, as well as time-dependent alterations, suggesting the exercise duration as an important factor to be considered in high polluted ambient. It were not observed significant alterations in any of the other analyzed variables. The exercise intensity did not show significant alterations in any of the analyzed parameters. It is possible that the lower exercise duration might be responsible for the absence of specif responses to exercise in polluted condition. In turn, metabolome pointed out different pathways affected by the polluted condition when the exercise was performed at higher intensity, suggesting that exercise intensity might be an important factor, but in longer exercise durations than the utilized in the present study. In conclusion, our results suggest that when exercise is performed at polluted ambient, longer exercise durations are able to induce more exacerbated responses to air pollutants inhalation, as increased arterial pressure and inflammation, as well as metabolome alterations. On the other hand, exercise intensity seems not significantly influence the biological responses to polluted ambient, at least in the tested conditions.

Key words: air pollution; exercise, health, inflammation, metabolomics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fotografia da famosa torre do relógio Big Ben em Londres, 1952, durante o episódio conhecido como *London Smog* (fonte: <http://seuhistory.com/>)..... 31
- Figura 2. Mapa mundial trazendo as os níveis de poluição em associação com a população das cidades (<https://air.plumelabs.com/en/>). Acessado em 12/01/2017 34
- Figura 3. Estações de medição dos níveis de poluição atmosférica no mundo cadastradas na plataforma World Air Quality Index Project (<http://aqicn.org/here/>). Acessado em 06/12/2016 35
- Figura 4. Média anual de PM_{2,5} nas 10 cidades mais limpas e 10 mais poluídas. Os países com as cidades mais limpas estão em cinza claro. Os países com as cidades mais poluídas estão em cinza escuro. Os dados são relativos às concentrações médias anuais de PM_{2,5} em cada cidade em $\mu\text{g.m}^{-3}$. (fonte: http://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair/databases/en/)..... 36
- Figura 5. Vista aérea de Paris durante episódio repentino de aumento dos níveis de poluição atmosférica em dezembro de 2016. (fonte: http://brasil.elpais.com/brasil/2015/03/22/internacional/1427059431_243348.html) 37
- Figura 6. Concentração de PM_{2,5} em Paris (A) e em São Paulo (B) no dia 06/12/2016 (<http://aqicn.org/here/>). Acessado em 06/12/2016 38
- Figura 7. *Continuum* das ciências ômicas que compreende genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, suas moléculas-alvo, o significado de sua leitura e sua proximidade com o fenótipo (adaptada de DETTMER et al., 2007) 41
- Figura 8. Representação esquemática do contêiner onde foram realizadas as coletas de dados 48

ESTUDO 1: Análise da influência da duração do exercício realizado em ambiente com poluição atmosférica sobre o sistema cardiovascular, inflamação e metabóloma

Figura 1. Representação esquemática do desenho experimental (painel A) e de uma única sessão (painel B). O quadro em cinza representa a sessão experimental realizada em ambiente poluído. TPE: teste progressivo até a exaustão voluntária. No quadro A, as foram 2 e 3 serão randomizadas. No quadro B, as setas indicam os momentos de coleta de sangue, da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da percepção subjetiva de esforço (PSE)..... 52

Figura 2. Concentração dos poluentes por ambiente. PM_{2,5}: material particulado com diâmetro de 2,5 µm ou menor; PM_{TOTAL}: material particulado total. NO: óxido de nitrogênio; NO₂: dióxido de nitrogênio. * Significativamente maior comparado ao mesmo poluente no ambiente limpo (p < 0,05) 54

Figura 3. Frequência cardíaca (painel A) e ventilação estimada (painel B) por ambiente 55

Figura 4. Percepção subjetiva de esforço com 30, 60 e 90 minutos de exercício por ambiente 56

Figura 5. Delta da pressão arterial sistólica e diastólica por ambiente. * Significativamente maior comparado ao ambiente limpo (p < 0,05) 56

Figura 6. Comportamento e boxplot dos dados após o processo de normalização 59

Figura 7. Análise de PCA do perfil metabolômico após 30 minutos de exercício por ambiente. Δ perfis metabolômicos em ambiente limpo; + perfis metabolômicos em ambiente poluído 60

Figura 8. Análise de PLS-DA do perfil metabolômico após 30 minutos de exercício por ambiente. ○ perfis metabolômicos em ambiente limpo; ● perfis metabolômicos em ambiente poluído 61

Figura 9. Análise de PCA do perfil metabolômico após 60 minutos de exercício por ambiente. Δ perfis metabolômicos em ambiente limpo; + perfis metabolômicos em ambiente poluído 63

Figura 10. Análise de PLS-DA do perfil metabolômico após 60 minutos de exercício por ambiente. ○ perfis metabolômicos em ambiente limpo; ● perfis metabolômicos em ambiente poluído 64

Figura 11. Análise de PCA do perfil metabolômico após 90 minutos de exercício por ambiente. Δ perfis metabolômicos em ambiente limpo; + perfis metabolômicos em ambiente poluído 66

Figura 12. Análise de PLS-DA do perfil metabolômico após 90 minutos de exercício por ambiente. $\circ$ perfis metabolômicos em ambiente limpo; $\bullet$ perfis metabolômicos em ambiente poluído..... 67

ESTUDO 2: Análise da influência da intensidade do exercício realizado em ambiente com poluição atmosférica sobre o sistema cardiovascular, inflamação e metabóloma

Figura 1. Representação esquemática do desenho experimental (painel A) e de uma única sessão (painel B). Os quadros em cinza representam as sessões experimentais realizadas em ambiente poluído. TPE: teste progressivo até a exaustão voluntária. No painel A, as sessões de 2 a 5 foram randomizadas. No painel B, as setas indicam os momentos de coleta de sangue, da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da percepção subjetiva de esforço (PSE).... 89

Figura 2. Concentração dos poluentes por ambiente. Painel A: exercício de baixa intensidade; Painel B: exercício de alta intensidade. PM_{2,5}: material particulado com diâmetro de 2,5 µm ou menor; PM_{TOTAL}: material particulado total. NO: óxido de nitrogênio; NO₂: dióxido de nitrogênio. * Significativamente maior comparado ao mesmo poluente no ambiente limpo na mesma intensidade de exercício (p < 0,05) 91

Figura 3. Frequência cardíaca por ambiente nos exercícios de baixa intensidade (painel A) e alta intensidade (painel B) 92

Figura 4. Ventilação por ambiente nos exercícios de baixa intensidade (painel A) e alta intensidade (painel B) 93

Figura 5. Percepção subjetiva de esforço após os 30 minutos de exercício em baixa intensidade e alta intensidade por ambiente 93

Figura 6. Delta da pressão arterial sistólica e diastólica por ambiente. Painel A: exercício de baixa intensidade; painel B: exercício de alta intensidade 94

Figura 7. Comportamento e boxplot dos dados após o processo de normalização 97

Figura 8. Análise de PCA do perfil metabolômico após 30 minutos de exercício por ambiente. Δ perfis metabolômicos em ambiente limpo; + perfis metabolômicos em ambiente poluído 98

Figura 9. Análise de PLS-DA do perfil metabolômico após 30 minutos de exercício por ambiente. ○ perfis metabolômicos em ambiente limpo; ● perfis metabolômicos em ambiente poluído 99

Figura 10. Análise de PCA do perfil metabolômico após 30 minutos de exercício em alta intensidade por ambiente. Δ perfis metabolômicos em ambiente limpo; + perfis metabolômicos em ambiente poluído 101

Figura 11. Análise de PLS-DA do perfil metabolômico após 30 minutos de exercício por ambiente. $\circ$ perfis metabolômicos em ambiente limpo; $\bullet$ perfis metabolômicos em ambiente poluído 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Padrões da Organização Mundial de Saúde e do Conselho Nacional do Meio Ambiente para a concentração de poluentes atmosféricos	33
Tabela 2. Idade, variáveis antropométricas, variáveis fisiológicas e IPAQ (n = 10)	49

ESTUDO 1: Análise da influência da duração do exercício realizado em ambiente com poluição atmosférica sobre o sistema cardiovascular, inflamação e metaboloma

Tabela 1. Temperatura e umidade relativa do ar durante as sessões em ambiente limpo e poluído	55
Tabela 2. Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca nos diferentes momentos por ambiente (n = 10).....	57
Tabela 3. Fold change das interleucinas sanguíneas nos diferentes momentos por ambiente (n = 10).....	58
Tabela 4. Metabólitos selecionados na análise de PLS-DA como mais capazes de diferenciar o metaboloma em ambiente limpo e poluído aos 30 minutos de exercício (n = 10).....	62
Tabela 5. Metabólitos selecionados na análise de PLS-DA como mais capazes de diferenciar o metaboloma em ambiente limpo e poluído aos 60 minutos de exercício (n = 10).....	65
Tabela 6. Metabólitos selecionados na análise de PLS-DA como mais capazes de diferenciar o metaboloma em ambiente limpo e poluído aos 90 minutos de exercício (n = 10).....	68
Tabela 7. Principais metabólitos responsáveis pela diferenciação do metaboloma no ambiente poluído em comparação ao ambiente limpo em cada momento.....	69

ESTUDO 2: Análise da influência da intensidade do exercício realizado em ambiente com poluição atmosférica sobre o sistema cardiovascular, inflamação e metaboloma

Tabela 1. Temperatura e umidade relativa do ar durante as sessões em ambiente limpo e poluído	92
Tabela 2. Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca nos exercícios de baixa e alta intensidade por ambiente (n = 10)	95
Tabela 3. Fold change das interleucinas sanguíneas nos diferentes momentos por ambiente (n = 10).....	96
Tabela 4. Metabólitos selecionados na análise de PLS-DA como mais capazes de diferenciar o metaboloma em ambiente limpo e poluído na baixa intensidade (n = 10)	100
Tabela 5. Metabólitos selecionados na análise de PLS-DA como mais capazes de diferenciar o metaboloma em ambiente limpo e poluído na alta intensidade (n = 10).....	103
Tabela 6. Principais metabólitos responsáveis pela diferenciação do metaboloma no ambiente poluído em comparação ao ambiente limpo nos exercícios de baixa e alta intensidade	104

LISTA DE ABREVIACÕES

ANOVA: *Analysis of Variance*
CET: Companhia de Engenharia de Tráfego
CO: Monóxido de carbono
CO₂: Dióxido de carbono
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
CTE: Cadeia de transporte de elétrons
DNA: Ácido desoxirribonucleico
EUA: Estados Unidos da América
FC: Frequência cardíaca
FCmax: Frequência cardíaca máxima
GLUT4: *Glucose transporter 4*
HEPA: *High Efficiency Particulate Arrestance*
HF: *High frequency*
HMDB: *Human Metabolome Database*
HMβ: β-hidroxi-β-metilbutirato
IL-1: Interleucina 1
IL-10: Interleucina 10
IL-6: Interleucina 6
IMC: Índice de massa corporal
IPAQ: *International Physical Activity Questionnaire*
LDH: Lactato desidrogenase
LF/HF: *Low frequency/High frequency ratio*
LF: *Low frequency*
LV: Limiar ventilatório
MCP1: *Monocyte Chemoattractant Protein-1*
MDA: Média diária anual
MIP1: *Macrophage inflammatory protein-1*
NO: Óxido de nitrogênio
NO₂: Dióxido de nitrogênio
NO_x: Óxidos de nitrogênio
O₂: Gás oxigênio
O₃: Ozônio

OMS: Organização Mundial de Saúde

PA: Pressão arterial

Pb: Chumbo

PCA: Análise de Componentes Principais

PCR: Ponto de compensação respiratória

PGC-1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*

pH: potencial hidrogeniônico

PLS-DA: Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais

PM: material particulado

PM₁₀: Material particulado com 10 μ m de diâmetro aerodinâmico ou menos

PM_{2,5}: Material particulado com 2,5 μ m de diâmetro aerodinâmico ou menos

PM_{TOTAL}: Material particulado total

pNN50: Porcentagem dos intervalos RR adjacentes com diferença de duração maior que 50 ms

PSE: Percepção subjetiva de esforço

RMN: Ressonância magnética nuclear

RMSSD: raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes

RNA: Ácido ribonucleico

RR: Intervalo RR

SD1: Índice de registro instantâneo da variabilidade da frequência cardíaca batimento a batimento

SD2: Índice da variabilidade da frequência cardíaca em registros de longa duração

SDNN: Desvio padrão de todos os intervalos RR normais gravados em um intervalo de tempo

SO₂: Dióxido de enxofre

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

TPE: Teste progressivo até a exaustão

VO₂max: Consumo máximo de oxigênio

VCO₂: Volume de dióxido de carbono expirado

VE: Ventilação minuto

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

VFC: Variabilidade da frequência cardíaca

VIP: *Variable Importance in Projection*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	Poluição atmosférica e saúde	24
1.2	Exercício físico e poluição atmosférica	26
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo geral	29
2.2	Objetivos específicos	29
3	REVISÃO DE LITERATURA	30
3.1	Poluição atmosférica: uma breve perspectiva histórica	30
3.2	Os <i>smogs</i> e sua relação com medidas governamentais de controle	30
3.3	Distribuição da poluição atmosférica no cenário atual	33
3.4	Efeitos crônicos da interação exercício-poluição	39
3.5	Análise do metaboloma: breve introdução aos conceitos	40
4	METODOLOGIA GERAL	43
4.1	Amostra	43
4.2	Padronização da dieta e lanche	43
4.3	Medidas antropométricas	43
4.4	Teste progressivo até a exaustão	44
4.5	Medidas cardiovasculares	44
4.6	Estimativa da ventilação através da frequência cardíaca	45
4.7	Coletas sanguíneas e preparação das amostras	45
4.8	Análise das citocinas sanguíneas	45
4.9	Análise dos metabólitos sanguíneos	46
4.10	Aquisição do espectro e identificação dos metabólitos	46
4.11	Busca de vias metabólicas na análise do metaboloma	46
4.12	Local de realização das coletas de dados	47
4.13	Análise dos poluentes atmosféricos	48
4.14	Caracterização da amostra	48
5	ESTUDO 1: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA DURAÇÃO DO EXERCÍCIO REALIZADO EM AMBIENTE COM POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR, INFLAMAÇÃO E METABOLOMA	50
5.1	Introdução	50
5.2	Metodologia específica	52

5.2.1 Desenho experimental	52
5.2.2 Testes de cargas constantes	52
5.2.3 Análise estatística	53
5.3. Resultados.....	54
5.3.1 Concentração dos poluentes	54
5.3.2 Temperatura e umidade relativa do ar	55
5.3.3 Frequência cardíaca e ventilação	55
5.3.4 Percepção subjetiva de esforço.....	55
5.3.5 Pressão arterial.....	56
5.3.6 Variabilidade da frequência cardíaca	57
5.3.7 Citocinas	58
5.3.8 Análise exploratória do metaboloma	58
5.3.9 Efeitos de 30 minutos de exercício.....	59
5.3.10 Efeitos de 60 minutos de exercício.....	63
5.3.11 Efeitos de 90 minutos de exercício.....	66
5.3.12 Metabólitos de diferenciação entre os ambientes para cada momento.....	69
5.4 Discussão	70
5.4.1 Qualidade do ar nas diferentes condições.....	70
5.4.2 Comportamento da ventilação, frequência cardíaca e percepção subjetiva de esforço...	71
5.4.3 Variabilidade da frequência cardíaca	72
5.4.4 Alteração da pressão arterial no ambiente poluído.....	73
5.4.5 Citocinas sanguíneas.....	74
5.4.6 Metaboloma	75
5.4.7 Metaboloma e bioenergética.....	76
5.4.8 Metaboloma, inflamação, estresse oxidativo e outras alterações biológicas.....	78
5.5 Conclusão	84
6 ESTUDO 2: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE DO EXERCÍCIO REALIZADO EM AMBIENTE COM POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR, INFLAMAÇÃO E METABOLOMA	86
6.1 Introdução	86
6.2 Metodologia específica.....	88
6.2.1 Desenho experimental	88
6.2.2 Testes de cargas constantes em intensidade baixa	89
6.2.3 Testes de cargas constantes em intensidade alta	89

6.2.4	Análise estatística	90
6.3	Resultados	91
6.3.1	Concentração dos poluentes	91
6.3.2	Temperatura e umidade relativa do ar	91
6.3.3	Frequência cardíaca e ventilação	92
6.3.4	Percepção subjetiva de esforço	93
6.3.5	Pressão arterial	94
6.3.6	Variabilidade da frequência cardíaca	94
6.3.7	Citocinas sanguíneas	96
6.3.8	Análise exploratória do metaboloma	96
6.3.9	Metaboloma no exercício de baixa intensidade	97
6.3.10	Metaboloma no exercício de alta intensidade	101
6.3.11	Metabólitos de diferenciação entre os ambientes para cada intensidade	104
6.4	Discussão	105
6.4.1	Qualidade do ar nas diferentes condições	105
6.4.2	Parâmetros cardiovasculares e percepção subjetiva de esforço	105
6.4.3	Comportamento das citocinas sanguíneas	107
6.4.4	Metaboloma	108
6.4.5	Metaboloma e bioenergética	108
6.4.6	Metaboloma, inflamação, estresse oxidativo e outras alterações biológicas	110
6.4.6.1	Baixa intensidade	110
6.4.6.2	Alta intensidade	111
6.5	Conclusão	112
7	LIMITAÇÕES	113
8	CONCLUSÃO GERAL	114
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
	ANEXOS	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 Poluição atmosférica e saúde

A crescente preocupação com os malefícios advindos da poluição atmosférica fez também crescer o número de estudos acerca desse tema, tornando unânime a ideia de que a exposição à poluição do ar resulta em efeitos nocivos para a saúde humana (CUTRUFELLO et al., 2012; GILES; KOEHLE, 2014). Tal fato se torna ainda mais preocupante para habitantes de grandes centros urbanos, onde há uma grande concentração de pessoas convivendo com numerosas indústrias e uma elevada frota de automóveis, sendo essas as principais fontes poluentes atualmente (PATILL et al., 2015; SAMET et al., 2015). Dessa forma, a exposição à poluição pode desencadear diferentes processos fisiológicos no organismo, dependendo das concentrações do poluente no ar e do tipo de poluente ao qual o indivíduo está exposto (OMS, 2005; GILES; KOEHLE, 2014).

Sabe-se o principal contato dos indivíduos com a poluição atmosférica ocorre através das vias aéreas. O processo de respiração faz com que haja um trânsito constante de poluentes através do sistema respiratório, desde as porções superiores podendo chegar até os alvéolos pulmonares (ORAVISJARVI et al., 2011; GILES; KOEHLE, 2014). Dessa forma, as estruturas que formam o sistema respiratório estão sujeitas a um efeito local dos poluentes atmosféricos. Aris et al. (1993) observaram uma diminuição nos valores de parâmetros da função pulmonar em exposição a 0,2 ppm de ozônio em comparação ao ar sem a presença desse gás. Através de lavagem broncoalveolar, também foi detectado que a porcentagem de neutrófilos (O_3 : $7,6 \pm 3,9$ vs ar: $2,1 \pm 3,0$), assim como as concentrações de LDH (O_3 : $18,0 \pm 19,4$ vs ar: $9,6 \pm 3,8$ U.L⁻¹), proteína total (O_3 : $0,20 \pm 0,08$ vs ar: $0,11 \pm 0,05$ mg.mL⁻¹), albumina (O_3 : $112,9 \pm 35,6$ vs ar: $54,8 \pm 20,2$ µg.mL⁻¹), fibronectina (O_3 : $262,8 \pm 96,3$ vs ar: $122,8 \pm 86,7$ ng.mL⁻¹) e α -1-antitripsina (O_3 : $609,6 \pm 141,0$ vs ar: $533,2 \pm 60,5$ ng.mL⁻¹) foram significativamente maiores na exposição ao ozônio comparada ao ar limpo, sugerindo uma resposta inflamatória local no sistema respiratório com a exposição ao ozônio. Inclusive, acredita-se que indivíduos com patologias no sistema respiratório estão mais susceptíveis aos efeitos da poluição (BRUNST et al., 2015), assim como a exposição à poluição na infância pode aumentar a chance de desenvolvimento de doenças respiratórias (PEARCE et al., 2015).

Achados prévios também têm sugerido que alguns gases poluentes e PM com menores diâmetros ($< 2,5$ µm) são capazes de ultrapassar o sistema respiratório, atingindo a corrente sanguínea e causando efeitos sistêmicos no organismo (BELL et al., 2014; BOS et al., 2014). Um dos efeitos da exposição à poluição mais investigados até o presente momento é o

aumento de marcadores inflamatórios sistêmicos (NEL et al., 1998; GHIO; DEVLIN, 2001; BACH et al., 2015). Viehmann et al. (2015) observaram que um aumento de $2,4 \mu\text{g.m}^{-3}$ na exposição crônica ao $\text{PM}_{2,5}$ estava associado a um aumento médio de 5,4% na concentração sanguínea de repouso da proteína C-reativa, sugerindo uma contribuição do estado inflamatório para os efeitos da poluição atmosférica. Brucker et al. (2013) observaram, em taxistas constantemente expostos à poluição do ar causada pelo tráfego de veículos, aumentos significativos em marcadores pró-inflamatórios no sangue, como IL-6 ($36,6 \pm 6,3 \text{ pg.mL}^{-1}$) e $\text{TNF}\alpha$ ($32,7 \pm ,5 \text{ pg.mL}^{-1}$), e diminuição significativa na IL-10 ($-41,24 \pm 2,1 \text{ pg.mL}^{-1}$), um marcador anti-inflamatório. Em conjunto, esses estudos apontam para um aumento do quadro inflamatório sistêmico em indivíduos expostos à poluição atmosférica, o que pode, por sua vez, desencadear processos nocivos em diferentes locais do organismo.

Como resultado desse aumento do quadro inflamatório e, possivelmente, também do estresse oxidativo, os efeitos da exposição à poluição têm sido observados em outros sistemas fisiológicos, sendo o mais investigado o cardiovascular (JOMOVA; VALKO, 2011; SUWA et al., 2002; YATERA et al., 2008; BRUCKER et al., 2014). Uma patologia cardiovascular amplamente conhecida é a aterosclerose, a qual se caracteriza pela formação de placas nas paredes das artérias, dificultando o fluxo sanguíneo e podendo estar associadas a outras complicações, como hipóxia de alguns tecidos e a formação de coágulos (USMAN et al., 2015). Esses coágulos podem atingir vasos menores, bloqueando o fluxo sanguíneo e aumentando a chance de ocorrência de infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico (USMAN et al., 2015). De fato, tem sido demonstrado que o aumento de processos inflamatórios decorrente da poluição atmosférica é capaz de influenciar no desenvolvimento da aterosclerose (SUWA et al., 2002). Yatera et al. (2008) observaram que, comparada ao ar limpo, a exposição ao PM_{10} resultou em um aumento na área da parede da artéria ocupada pela placa, assim como um maior recrutamento de monócitos na placa aterosclerótica ($4.400 \text{ vs. } 400.\text{mm}^{-3}$, aproximadamente) e no músculo liso abaixo da placa ($3.500 \text{ vs. } 500.\text{mm}^{-3}$, aproximadamente). Além disso, a exposição à poluição do ar mostrou estar associada a um maior risco de eventos cardiovasculares, como infarto agudo do miocárdio (MANNISTO et al., 2015).

Além dos estudos supracitados, um número crescente de estudos tem demonstrado também que o nível de poluição atmosférica é capaz de influenciar também a ocorrência de doenças associadas à síndrome metabólica (EZE et al., 2015; WEI et al., 2016). A síndrome metabólica é um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de risco cardiovascular relacionados à deposição central de gordura e à resistência à insulina. Tem

sido observado que a ocorrência de fatores ligados a essa síndrome podem ser capazes de aumentar a mortalidade geral em 50% e a cardiovascular em até 150% (LAKKA et al., 2002; GANG et al., 2004). Em relação à obesidade, um estudo conduzido na região sul do Estado da Califórnia (EUA) mostrou que a exposição à poluição do ar próxima a rodovias estava relacionada com a obesidade e o aumento do IMC em crianças de 5 a 11 anos (JERRET et al., 2014). Em outro estudo conduzido pelo mesmo grupo de pesquisa (MCCONNELL et al., 2015), foi observado que a exposição à poluição, fumo passivo e tabagismo da mãe durante a gravidez estavam associados com o aumento do IMC durante a adolescência e com o valor de IMC estimado para a idade de 18 anos. Foi sugerido que esses fatores, em conjunto, poderiam ser responsáveis por um excesso de peso corporal de 6 kg no início da idade adulta.

Outro fator considerado no estabelecimento da síndrome metabólica é a resistência à insulina, ocorrente no diabetes mellitus. Interessantemente, diferentes estudos têm mostrado que a poluição atmosférica é capaz de aumentar a resistência à insulina, o que pode desencadear todas as consequências relacionadas com esse quadro, como o próprio diabetes, obesidade, risco de doenças cardiovasculares, dislipidemia, entre outros. Meo et al. (2015) revisaram 102 artigos publicados acerca da influência da poluição na resistência à insulina. Esses autores mostraram que a poluição está fortemente relacionada à ocorrência de resistência à insulina e à incidência de diabetes mellitus.

1.2 Exercício físico e poluição atmosférica

Diferentemente da poluição atmosférica, a prática sistemática de exercícios físicos predominantemente aeróbios tem mostrado inúmeros benefícios para a saúde. Um elevado número de estudos tem investigado o papel desses exercícios na função do sistema cardiovascular (GREEN, 2009; PADILLA et al., 2011), do tecido muscular (VAN DEN BERG et al., 2015), do tecido ósseo (HINTON et al., 2015) e até mesmo do sistema nervoso (REZENDE BARBOSA et al., 2015). Em conjunto, os dados da maioria desses estudos apontam para uma melhora das funções do organismo através da prática de exercícios físicos. Por exemplo, Scharf et al. (2015) observaram aumentos significativos nos volumes do ventrículo esquerdo (pré: $77,1 \pm 8,5$; pós: $83,9 \pm 8,6$ mL.m²) e do ventrículo direito (pré: $80,5 \pm 8,5$; pós: $86,6 \pm 8,1$ mL.m²) após 16 semanas de treinamento aeróbio em 84 indivíduos sedentários. Zhao et al. (2015) demonstraram que a distância de caminhada diária estava associada com um decréscimo na mortalidade de indivíduos jovens e idosos com ou sem patologias, independentemente de outros fatores intervenientes, como o índice de massa

corporal e histórico de doenças. Tais resultados ilustram de uma maneira resumida o importante papel do exercício para a qualidade de vida.

Contudo, é preciso considerar determinadas situações nas quais a prática de exercícios poderia gerar resultados adversos comparados àqueles estabelecidos na literatura científica. Uma dessas situações é a realização de exercício com exposição à poluição atmosférica (BOS et al., 2014; GILES; KOEHLE, 2014). Infelizmente, alguns estudos têm sugerido que a realização de exercícios físicos em ambiente poluído pode maximizar os efeitos deletérios da poluição de forma aguda, principalmente por dois mecanismos. O primeiro deles é o aumento na ventilação. Durante a transição do esforço para o exercício ocorre um aumento na demanda de oxigênio, a qual eleva a ventilação minuto (VE) e aumenta a quantidade de gases e partículas inalados (INT PANIS et al., 2010). O segundo mecanismo é a transição da respiração de predominantemente nasal para oronasal (NIINIMAA et al., 1980), pois a primeira camada de filtro do ar inspirado se encontra na cavidade nasal (ORAVISJARVI et al., 2011). Consequentemente, a maior participação da respiração oral pode levar uma maior quantidade de partículas e gases poluentes até os alvéolos, potencialmente aumentando os efeitos nocivos da poluição.

Pekkanen et al. (2002) observaram que, quando houve exposição prévia ao $PM_{2,5}$, o risco de depressão no segmento ST, um indicativo de infarto agudo do miocárdio, aumentou significativamente durante o exercício. Ao analisarem indivíduos expostos a altas concentrações de PM, Nyhan et al. (2014) demonstraram uma maior deposição alveolar de PM entre aqueles que se transportavam ativamente (pedestres: $18,7 \pm 17,2 \mu g$; ciclistas: $36,8 \pm 36,5 \mu g$) comparados aos indivíduos que se transportavam de forma passiva (passageiros de ônibus: $7,7 \pm 5,1 \mu g$; passageiros de trem: $14,4 \pm 11,1 \mu g$) ($p < 0,05$). Jacobs et al. (2010) também observaram que o exercício causou um aumento significativo de neutrófilos sanguíneos de indivíduos saudáveis no ambiente poluído (4,6%; $p = 0,04$), mas não no ambiente limpo (2,4%; $p = 0,32$).

Embora os mecanismos supracitados de aumento da ventilação e transição para a respiração oronasal sugiram que a intensidade e a duração do exercício podem maximizar os efeitos da poluição, a maioria dos estudos que investigaram as consequências do exercício em ambiente poluído não levou em consideração esses fatores, utilizando o exercício de maneira simplista. De forma geral, a maioria dos estudos utiliza exercício contínuos com intensidades moderadas (AVOL et al., 1983; BRAUN-FAHRLANDER et al., 1994; FOLINSBEE et al., 2000; PEKKANEN et al., 2002), testes incrementais (ANDERSON et al., 1973; ALLRED et al., 1991; KLEINMAN et al., 1998) e, em menor número, testes contra-relógio

(SCHELEGLE; ADAMS, 1986; GILES et al., 2012), não permitindo concluir com clareza acerca da influência de exercício com diferentes intensidades e durações.

Além disso, deve-se observar que, de acordo com os estudos descritos na presente Tese, ao entrar em contato com a corrente sanguínea, os efeitos deletérios dos poluentes atmosféricos em nosso organismo tornam-se sistêmicos (GILES et al., 2012). Isso poderia indicar que, além dos efeitos negativos já reportados no sistema cardiovascular, como aumento do risco de eventos cardíacos (LANKI et al., 2006), do *stiffness* arterial (LUNDBÄCK et al., 2009) e favorecimento da evolução de placas de ateroma (Suwa et al. 2002), a interação exercício/poluição poderia promover adaptações fisiológicas indesejáveis ainda desconhecidas. Estudos relativamente mais recentes têm utilizado a técnica de metabolômica para descrever o perfil metabólico global durante o exercício (BRUGNARA et al., 2012; NIEMAN et al., 2014). Por exemplo, um grupo de pesquisadores liderados por David Nieman demonstrou que, após exercícios extenuantes para ciclistas (contrarrelógio de 75 km) e corredores (treinamento intensificado de três dias), metabólitos associados ao estresse oxidativo e à via lipídica foram aumentados imediatamente e 1,5 h após para os ciclistas; imediatamente e 14 horas pós para os corredores (NIEMAN et al., 2013, 2014). Em relação à poluição, Brower et al. (2016) observaram alterações no metaboloma de camundongos em resposta à exposição de 6 horas a $300 \mu\text{g.m}^{-3}$ de emissões de gasolina e diesel. Mais especificamente, foi sinalizado aumento do estresse oxidativo, peroxidação lipídica, inflamação e alterações metabólicas após a exposição à emissões de combustíveis em relação ao ar limpo. Coletivamente, esses estudos indicam que a metabolômica é uma técnica com elevado potencial para investigar as resposta metabólicas sistêmicas induzidas pela interação exercício/poluição.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral foi analisar a influência do exercício físico predominantemente aeróbio realizado em ambiente poluído sobre o sistema cardiorrespiratório, perfil inflamatório e metabólico.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos da presente Tese de Doutorado foram organizados em dois estudos, os quais foram conduzidos no intuito de investigar:

Estudo 1: A influência da duração do exercício físico realizado em ambiente poluído sobre a frequência cardíaca, ventilação minuto, pressão arterial, percepção subjetiva de esforço, concentração de citocinas relacionadas à inflamação e o metaboloma.

Estudo 2: A influência da intensidade do exercício físico realizado em ambiente poluído sobre frequência cardíaca, ventilação minuto, pressão arterial, percepção subjetiva de esforço, concentração de citocinas relacionadas à inflamação e o metaboloma.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Poluição atmosférica: uma breve perspectiva histórica

A conversão de energia química em outro tipo, como mecânica ou térmica, está intimamente ligada à liberação de resíduos. Dessa forma, qualquer processo químico que irá culminar em liberação de energia irá também produzir resíduos da reação inicial, sendo importante sua administração, uma vez que esses podem ser constituídos por compostos nocivos seja ao meio ambiente seja à saúde, podendo então ser chamados de poluentes. Portanto, a eliminação e tratamento adequados de poluentes sólidos, líquidos e gasosos são necessários para evitar a contaminação do meio ambiente. Ao se considerar a perspectiva histórica dos processos geradores de energia, o que se percebe é uma gigantesca evolução em sua quantidade e eficiência. Contudo, infelizmente, devido ao grande aumento na demanda energética pelo aumento da população, a administração dos poluentes não acompanhou o aumento da eficiência da produção de energia, o que resultou em quadros de poluição enfrentados ao longo da história em distintos locais do planeta.

É possível que entre quatro e cinco milhões de anos atrás tenha surgido o *Australopithecus afarensis* (ALEMSEGED et al., 2006), que parece ser o mais próximo ancestral do *Homo erectus*. Uma de suas características, a qual se mantém até os dias de hoje, é atuar na natureza de forma transformadora e, muitas vezes, predatória. Particularmente a esse longínquo período, merece destaque a capacidade de manuseio do fogo adquirida cerca de 800 mil anos a.C., sendo um marco para o início da contribuição do homem na deterioração da qualidade do ar. Além disso, ainda em civilizações antigas, o desmatamento predatório levou à destruição de imensas áreas de florestas, caracterizando ainda mais o início da enorme magnitude da intervenção do homem no planeta. Ainda na era pré-cristã, existem relatos da preocupação com a qualidade do ar principalmente devido à utilização do carvão como combustível.

3.2 Os *smogs* e sua relação com medidas governamentais de controle

Posteriormente, já no século XII d.C. foram baixados na Inglaterra os primeiros atos de controle da poluição. Já no século XVIII, também na Inglaterra, ocorreu o que talvez tenha sido um dos maiores marcos do aumento da poluição na história do homem, a Revolução Industrial, intimamente ligada à invenção das máquinas a vapor que aumentavam a produção, mas também a poluição. Caminhando para a história mais recente, o surgimento de grandes centros urbanos colocou, em um mesmo local, fontes poluentes (indústrias e, posteriormente,

automóveis) e um grande número de pessoas, aumentando a exposição da população à poluição. Desse modo, os efeitos nocivos da poluição na saúde tornaram-se mais frequentes e preocupantes.

Em meados do século XX, ocorreram episódios de aumento repentino na poluição em algumas cidades da Europa e dos Estados Unidos, causando graves efeitos deletérios na saúde da população e aumento do número de mortes. Esses episódios ficaram conhecidos como *smogs*, uma mistura das palavras *smoke* (fumaça) e *fog* (nevoeiro). O mais grave desses episódios ocorreu em Londres no ano de 1952. Durante um episódio de inversão térmica, no qual o ar poluído fica retido próximo à superfície, a dispersão de poluentes ficou impedida, criando uma nuvem composta principalmente por material particulado (PM, do inglês *particulate matter*) e enxofre, atingindo concentrações até nove vezes maiores do que as normais e permanecendo sobre a cidade durante três dias. Nesse período, houve um aumento de 4000 mortes em relação ao normal (BELL; DAVIS, 2001). Abaixo, uma foto do famoso relógio Big Bang durante o episódio conhecido como *London Smog*, evidenciando o alto nível de poluição (figura 1).

Figura 1. Fotografia da famosa torre do relógio Big Ben em Londres, 1952, durante o episódio conhecido como *London Smog* (fonte: <http://seuhistory.com/>).

A preocupação com a poluição atmosférica tem aumentado gradativamente desde a metade do século passado, devido aos potenciais efeitos nocivos à saúde e às possíveis catástrofes ambientais. Em 1955, o congresso americano financiou pela primeira vez estudos

sobre o impacto da poluição atmosférica sobre a saúde e, na década de 60, o Departamento de Saúde Educação e Bem Estar Social dos Estados Unidos iniciou um programa para controle da poluição atmosférica. Contudo, foram necessárias as ocorrências de novos episódios de aumento súbito da poluição para que estabelecessem medidas mais concretas de controle da qualidade do ar. Somente a partir da década de 1960 e 1970, Estados Unidos e Europa, respectivamente, começaram a estabelecer padrões de qualidade baseados na concentração de alguns poluentes, como dióxido de enxofre (SO₂), monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrogênio (NO₂), ozônio (O₃) e chumbo (Pb).

Contudo, tais padrões de qualidade do ar não foram apreciados pelo setor industrial, que precisaria investir capital para o controle da emissão de poluentes. O caminho encontrado pelo setor industrial foi migrar para os países em desenvolvimento, onde o controle e a legislação para a emissão de poluentes praticamente inexistia. Isso significa que o problema da poluição atmosférica não foi resolvido nem sequer amenizado, alterando apenas o local das fontes de emissão. Assim, houve a necessidade de intervenção de uma organização global para que os níveis de poluição pudessem atender as diretrizes em qualquer local do planeta. A Organização Mundial de Saúde (OMS) tornou-se a responsável por desenvolver e indicar padrões de concentrações de poluentes atmosféricos, sendo o *Air Quality Guidelines: Global Update 2005* o mais recente guia lançado pela OMS. Nesse documento foram revisados os estudos que investigaram o impacto dos diferentes poluentes na saúde, caminhando-se então para o estabelecimento de concentrações de poluentes consideradas ideais para que não haja malefícios à população. Adicionalmente, alguns órgãos dos países em desenvolvimento também começaram a estabelecer padrões da qualidade do ar para um melhor controle. No Brasil, o órgão responsável por esse controle é o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Na tabela 1, estão resumidos os padrões de qualidade do ar estabelecidos pela OMS em 2005 e pelo CONAMA em 1990.

Tabela 1. Padrões da Organização Mundial de Saúde e do Conselho Nacional do Meio Ambiente para a concentração de poluentes atmosféricos.

Poluente	OMS				CONAMA			
	MDA	24 h	8 h	1 h	MDA	24 h	8 h	1 h
PM ₁₀ (µg.m ⁻³)	20	50	-	-	50	150	-	-
PM _{2,5} (µg.m ⁻³)	10	25	-	-	-	-	-	-
CO (µg.m ⁻³)	-	-	10.000	-	-	-	-	-
O ₃ (µg.m ⁻³)	-	-	100	-	-	-	160	-
SO ₂ (µg.m ⁻³)	-	20	-	200	80	365	-	320
NO ₂ (µg.m ⁻³)	40	-	-	200	100	-	320	-

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente; MDA: média diária anual; PM: material particulado; OMS: Organização Mundial de Saúde. Os valores representados para 24, 8 e 1 horas são as médias máximas para esses períodos (CONAMA, 1990; WHO, 2005).

Ao compararmos os padrões estabelecidos pela OMS e pelo CONAMA é possível observar que os valores do CONAMA são consideravelmente mais elevados, ou seja, o órgão brasileiro instaurou padrões mais permissivos à emissão de gases poluentes, sendo esse um atrativo para indústrias que não pretendem direcionar grande parte de suas finanças para o controle da emissão de poluentes. Além disso, os padrões do órgão brasileiro foram estabelecidos em 1990, não tendo sido atualizados de acordo com demanda e produção significativamente mais elevadas. Esses dados ilustram o quadro atual, no qual os países em desenvolvimento são, no geral, aqueles que possuem grandes problemas com poluição, devido à sua grande produção de bens e serviços e controle ainda precário da emissão de resíduos nocivos, tanto no ar quanto na água.

3.3 Distribuição da poluição atmosférica no cenário atual

Diferentemente do que se observava a cerca de um século atrás, as fontes de poluentes que mais preocupam atualmente, além das grandes indústrias, são os automóveis (SAMET; GRUSKIN, 2015). Com o aumento desenfreado na frota de automóveis, em paralelo com a urbanização da sociedade, o número de viagens diárias realizadas de automóvel, cobrindo longas distâncias e enfrentando tráfegos intensos e lentos cresceu substancialmente. Por exemplo, na cidade de São Paulo, segundo a Companhia de Engenharia de Tráfego (CET), em 2014 a velocidade média de deslocamento de carros durante o horário de pico da manhã (07:00 às 10:00 h) foi de 21 km.h⁻¹, enquanto no horário de pico da tarde (17:00 às 20:00 h) foi de 6,9 km.h⁻¹. Isso implica em uma série de problemas sociais, como: aumento do tempo

despendido em deslocamento, aumento do desgaste de vias, diminuição do tempo disponível para lazer e aumento da poluição atmosférica.

Esses dados exemplificam de maneira simples como a ausência de planejamento urbano (e sua execução) interferem radicalmente na qualidade de vida e saúde da população. Além disso, apesar desse aumento da contribuição da frota de automóveis ter atuado na “distribuição” mais igualitária da poluição, países subdesenvolvidos e em desenvolvimento ainda sofrem com maiores níveis de poluição atmosférica, ausência de planejamento e de meios para diminuição da emissão de poluentes sem prejuízos econômicos. Isso é mais evidente ainda em países que se industrializaram mais fortemente, como é o caso da China, como mostrado na figura 2.

Figura 2. Mapa mundial trazendo as os níveis de poluição em associação com a população das cidades (<https://air.plumelabs.com/en/>). Acessado em 12/01/2017.

Contudo, ao se analisar a figura acima é possível que se cometa erros de interpretação sobre a distribuição da poluição no planeta. Pode-se observar uma grande concentração de altos índices de poluição no sul e sudeste asiático, fortemente influenciado por China e Índia. Também é possível observar pontos de maiores níveis em países europeus e na América Central. Por outro lado, poucos dados são mostrados sobre América do Sul, África, Oriente

Médio e Rússia. A falta de dados sobre essas regiões, ao contrário do que se poderia pensar, não necessariamente reflete baixos níveis de poluição, mas a inexistência de estações de vigilância da qualidade do ar, como mostrado na figura 3, onde cada bandeira representa uma estação. Desse modo, é possível que os dados sobre a distribuição da poluição no mundo não estejam representando de maneira fiel a realidade da poluição ao redor do planeta.

Figura 3. Estações de medição dos níveis de poluição atmosférica no mundo cadastradas na plataforma World Air Quality Index Project (<http://aqicn.org/here/>). Acessado em 06/12/2016.

Essa ausência de dados, que poderiam deixar mais claro como a poluição atmosférica afeta as diferentes populações e ecossistemas ao redor do mundo, traz à tona o papel da poluição atmosférica na injustiça ambiental. Esse termo vem sendo discutido em artigos internacionais como *Environmental Injustice* e se refere às injustiças sociais promovidas pelo ambiente no qual as pessoas vivem (JUNGES; SELLI, 2008). Em relação à poluição do ar, é estudado como determinadas populações, geralmente mais pobres, estão mais sujeitas aos seus efeitos deletérios (JERRET, 2009; GRINESKI et al., 2013). Um modo claro de evidenciar essa desigualdade é analisando a publicação da OMS sobre os níveis de poluição nas cidades em 2016. Quando são elencadas as cidades mais limpas e mais poluídas, são evidentes as discrepâncias socioeconômicas entre essas duas classes, com as cidades mais limpas pertencendo todas a países desenvolvidos, ao passo que as mais poluídas pertencem todas a países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, como mostrado na figura 4 em relação ao $PM_{2.5}$. Com isso, fica clara a injustiça imposta por características econômicas até mesmo na qualidade do ar respirado pelas populações.

Figura 4. Média anual de PM_{2.5} nas 10 cidades mais limpas e 10 mais poluídas. Os países com as cidades mais limpas estão em cinza claro. Os países com as cidades mais poluídas estão em cinza escuro. Os dados são relativos às concentrações médias anuais de PM_{2.5} em cada cidade em μg.m⁻³. Fonte: http://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair/databases/en/.

Embora os dados da figura 4 ajudem a evidenciar que os países menos desenvolvidos sofrem mais com a emissão de poluentes, fatores como a alta demanda de consumo, com consequente produção de bens e serviços elevada, podem estar fazendo com que não se consiga por muito tempo “controlar” os locais mais sujeitos à poluição. Um acontecimento recente serve para ilustrar esse pensamento. No mês de dezembro de 2016, a cidade de Paris, capital da França, experimentou um aumento súbito da concentração de poluentes devido à contenção dos poluentes sobre a cidade em um episódio de inversão térmica (figura 5).

Figura 5. Vista aérea de Paris durante episódio repentino de aumento dos níveis de poluição atmosférica em dezembro de 2016. (fonte: http://brasil.elpais.com/brasil/2015/03/22/internacional/1427059431_243348.html).

A poluição atmosférica atingiu níveis tão alarmantes que pediram medidas governamentais, como o estabelecimento do transporte público grátis por alguns dias. A título de comparação, a figura 6 mostra os níveis de $PM_{2.5}$ na cidade de São Paulo, comumente preocupada com os níveis de poluição, e em Paris no dia 06 de dezembro de 2016. É possível observar que os níveis de Paris ficaram significativamente mais elevados nesse período.

Figura 6. Concentração de PM_{2.5} em Paris (A) e em São Paulo (B) no dia 06/12/2016 (<http://aqicn.org/here/>). Acessado em 06/12/2016.

Até o presente momento, apenas um estudo foi conduzido com o intuito de comparar exercícios de diferentes intensidades em ambiente poluído (GILES et al., 2014). Nesse estudo, os indivíduos pedalarão a 30% e 60% do VO₂max em ambiente poluído e não-poluído por 30 minutos. Foi observado que no exercício de baixa intensidade em ambiente poluído o

quociente respiratório foi significativamente menor, ao passo que a percepção subjetiva de esforço, a VE, o VO_2 e o VCO_2 foram maiores. Contudo, tais efeitos não foram observados no exercício de alta intensidade. Entretanto, é importante ressaltar que nesse estudo foram avaliadas apenas variáveis ventilatórias e perceptivas durante o exercício, sendo que a maioria dos estudos mostra alteração de padrões inflamatórios não diretamente relacionados aos parâmetros mensurados por Giles et al. (2014).

3.4 Efeitos crônicos da interação exercício-poluição

De maneira geral, os estudos citados anteriormente na presente Tese ilustram o quadro atual da literatura científica, o qual reporta que, de maneira aguda, a prática de exercícios físicos em ambiente com ar poluído pode resultar em uma maior inalação de poluentes, ampliando os malefícios da poluição do ar. Por outro lado, é interessante considerar os achados do estudo de Vieira et al. (2012), o qual foi conduzido em modelo animal. Nesse estudo, 32 camundongos foram separados em quatro grupos: 1) controle: os camundongos não eram expostos à poluição e não realizavam treinamento físico; 2) treinamento: os camundongos realizavam treinamento e não eram expostos à poluição; 3) exposição à poluição: os camundongos eram expostos ao ar poluído sem treinamento e; 4) treinamento + exposição: os camundongos eram expostos à poluição e realizavam treinamento. O treinamento aeróbico de intensidade moderada foi realizado 5 dias por semana durante 5 semanas. Após o período de 5 semanas, entre os dois grupos expostos à poluição, foi observado que o grupo que realizou treinamento apresentou menor aumento nas espécies reativas e oxigênio, óxido nítrico exalado e células totais e diferenciadas. Através de lavagem broncoalveolar, foi observado também que houve menor aumento nos níveis de IL-6 e TNF- α , número de neutrófilos e na densidade de colágeno no parênquima pulmonar. No mesmo sentido, foram observadas também menores concentrações plasmáticas de IL-6 e TNF- α e menor expressão de IL-1 e TNF- α em leucócitos do parênquima pulmonar nos camundongos expostos à poluição que se exercitavam comparados aos expostos sedentários. Em conjunto, esses resultados apontam para um papel protetor do treinamento físico contra as ações inflamatórias e de estresse oxidativo induzidas pela exposição à poluição atmosférica.

Nesse sentido, apesar de ainda não existirem estudos sobre o impacto do treinamento físico nas respostas à poluição do ar em humanos, o estudo de Vieira et al. (2012) sugere que a prática regular de atividades físicas pode exercer um ação antagônica à poluição atmosférica, sendo um interessante meio não-farmacológico de se combater os malefícios à saúde advindos da exposição a poluentes, principalmente em habitantes de grandes cidades.

Contudo, ainda é necessário que se estabeleça de maneira mais concreta alguns aspectos da prática de atividades físicas com esse fim, como distância de fontes poluidoras, horário do dia, características do exercício, entre outros.

Em resumo, tem sido mostrado que a realização de exercícios em ambiente poluído é capaz de aumentar a captação de poluentes do ar e os efeitos da poluição. Dessa forma, praticantes de atividades físicas devem procurar locais mais distantes de centros industriais e vias de tráfego intenso de veículos. Além disso, com a crescente divulgação do uso de bicicletas como meio de transporte nos grandes centros urbanos, a poluição do ar deve ser um dos fatores considerados na escolha de locais para a construção de ciclovias. Contudo, apesar de estar bem esclarecido que o exercício é capaz de aumentar os efeitos da exposição à poluição, ainda não foi investigado de que maneira a duração e a intensidade do exercício são capazes modular os efeitos da poluição atmosférica.

3.5 Análise do metaboloma: breve introdução aos conceitos

De um modo geral, as ciências ômicas se referem a campos que procuram investigar de maneira abrangente interações entre um grande número de informações, ou analitos. É possível traçar um *continuum* entre os principais campos dessas ciências: a genômica analisa as informações contidas nos genes; a transcriptômica, que analisa os RNA mensageiros, ou seja, a transcrição da mensagem contida no gene que pode resultar em uma molécula biologicamente ativa; a proteômica, que analisa as proteínas, como produto final da leitura do código genético seguida da tradução bem sucedida e, por fim; a metabolômica, que analisa os metabólitos, que são o produto indicador de que a proteína exerceu sua função. Mais recentemente, houve uma maior ramificação das ciências ômicas, como a lipidômica. Em comum, esses campos procuram analisar os eventos biológicos através de um espectro mais global entre as moléculas analisadas e suas interações (DETTMER et al., 2007).

Dentre esses campos citados, é possível afirmar que a metabolômica se relaciona mais fielmente o fenótipo do organismo, pois os metabólitos representam o “estado final” da expressão de um gene, uma vez que as informações contidas nos genes podem nem sempre percorrer todo o caminho necessário até a atuação real da proteína (SUMMER et al., 2003). A figura 7 esquematiza o *continuum* entre as ciências ômicas.

Figura 7. *Continuum* das ciências ômicas que compreende genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, suas moléculas-alvo, o significado de sua leitura e sua proximidade com o fenótipo (adaptada de DETTMER et al., 2007).

A análise do metaboloma exige técnicas e equipamentos robustos o suficiente para realizarem a leitura de uma vasta gama de moléculas na mesma amostra e ao mesmo tempo em que devem ser também sensíveis o suficiente para determinarem a concentração dos metabólitos com a maior precisão possível (ENEA et al., 2010; NIEMAN et al., 2015). Duas técnicas têm sido as mais empregadas para essa análise: a ressonância magnética nuclear (RMN) (D'ALESSANDRO et al., 2012) e a espectrometria de massas (HOFFMANN; STROOBANT, 2007). Comparativamente, existem vantagens e desvantagens entre essas duas técnicas, dependendo do desenho do estudo a ser realizado. A RMN exige uma preparação mais simples da amostra, assim como é mais simplificada também a identificação dos metabólitos, possui alta reprodutibilidade e é possível recuperar a amostra para análises posteriores. Por sua vez, a espectrometria de massas possui maior sensibilidade (podendo ler mais 1000 metabólitos dependendo da técnica contra cerca de 200-300 da RMN) e um menor tempo de análise, principalmente considerando-se grande quantidade de amostras.

Após a leitura das amostras pela técnica de ressonância, é gerado um espectro, o qual permite a identificação e quantificação dos metabólitos, como o *software* Chenomx NMR Suite[®] v. 8.2, o qual foi utilizado na presente tese. Para a quantificação, uma série de tratamentos é realizada no intuito de realizar uma tradução da curva espectral em concentrações de metabólitos específicos. Depois de quantificados os metabólitos, é preciso analisar o metaboloma de maneira a integrar os achados entre si e compará-los a outros grupos e amostras. Para isso, existem também *softwares* específicos, como o MetaboAnalyst (www.metaboanalyst.ca), também utilizado em nossas análises. Esse *software* permite a realização de procedimentos estatísticos comumente realizados nesse tipo de análise, como a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA). Por fim, bases de dados sobre o metaboloma permitem um maior estudo dos metabólitos para as inferências dos resultados obtidos, como a *Human Metabolome Database* (HMDB) (<http://www.hmdb.ca/>). Contudo, o uso exclusivo de uma base de dados, sem uma investigação mais minuciosa na literatura científica parece ser um risco de uma interpretação com pouca profundidade dos resultados.

Estudos analisando o metaboloma e envolvendo a prática de exercícios físicos são relativamente recentes. Talvez um dos primeiros estudos com essa temática específica tenha sido conduzido por Yan et al. (2009), no qual foi verificado um metaboloma distinto entre remadores de categorias etárias diferentes, e indivíduos sedentários. Um autor que tem se destacado na área é o professor David C. Nieman, com uma série de estudos analisando o metaboloma em diferentes situações relacionadas ao exercício físico, como intensificação do treinamento (NIEMAN et al., 2013), 75 km de ciclismo (NIEMAN et al., 2014), ingestão de frutas (NIEMAN et al., 2015), bebidas esportivas (KNAB et al., 2013) e suplementos (NIEMAN et al., 2012). Esses e outros estudos têm permitido analisar as respostas metabólicas ao exercício sob um espectro mais abrangente, de forma a integrar melhor as vias.

Apesar de ainda ser uma área extremamente recente, é grande a expectativa de que a análise do metaboloma relativa ao exercício forneça informações importantes acerca do impacto do exercício físico em parâmetros da saúde e do desempenho. Isso poderia fornecer dados importantes sobre, por exemplo, o impacto do exercício físico sobre diferentes funções, tecidos, órgãos e sistemas do organismo de uma forma integrativa.

4 METODOLOGIA GERAL

A seguir serão apresentadas as informações acerca da metodologia que são comuns aos estudos 1 e 2.

4.1 Amostra

Participaram voluntariamente do estudo 10 indivíduos jovens do sexo masculino. Como critério de inclusão, todos os participantes foram classificados como fisicamente ativos através da aplicação de um questionário internacional de atividade física previamente validado (IPAQ) (Fogelholm et al. 2006). Como critérios de exclusão, os indivíduos não poderiam apresentar nenhum tipo de doença cardiovascular ou pulmonar, não estarem fazendo uso de nenhum tipo de fármaco, esteróides anabolizantes, e não apresentar histórico de lesão recente que comprometesse a participação no estudo. Todos os procedimentos foram apreciados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (CAAE: 46954415.0.0000.5391) (ANEXO 1).

4.2 Padronização da dieta e lanche

No dia do teste progressivo até a exaustão, os voluntários receberam um recordatório a ser preenchido no dia anterior à primeira sessão de teste com as refeições realizadas. Nesse mesmo dia eles foram instruídos de que seria necessário replicar as refeições do recordatório nas demais sessões. Na primeira sessão, os voluntários trouxeram o recordatório, o qual foi registrado por meio de foto e devolvido ao voluntário para utilização antes das próximas sessões. Também foi entregue um novo recordatório para o dia prévio de cada sessão. Ao chegarem ao laboratório, os voluntários receberam um lanche padronizado. Após o lanche, foi feito o transporte até o local de coleta. O tempo dado entre o final do lanche e o início do teste foi de aproximadamente 45 minutos. Foi fornecida água *ad libitum* durante o período pré-teste e durante toda a sessão experimental.

4.3 Medidas antropométricas

As medidas antropométricas foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos por Lohman (1981). Os sujeitos foram pesados em balança eletrônica com escala de aproximação de 0.1 kg. A estatura foi medida com o uso de um estadiômetro, com aproximação de 0.1 cm.

4.4 Teste progressivo até a exaustão

Após 5 minutos de aquecimento em cicloergômetro (Biotek 2100, Cefise, Nova Odessa, SP, Brasil) na potência de 100 W e 70-80 rpm, a potência foi aumentada em 30 W a cada minuto até a exaustão voluntária do participante, a qual foi determinada pela incapacidade de manter o exercício mediante encorajamento verbal. As trocas gasosas foram mensuradas a cada respiração através de um analisador de gases estacionário (Cortex Metalyzer 3B, Cortex Biophysik, Leipzig, Germany) e subsequentemente calculadas as médias de períodos de 30 segundos ao longo do teste para posterior análise. Antes de cada teste, o analisador de gases foi calibrado de acordo com as recomendações do fabricante. O VO_2max foi determinado quando dois ou mais dos seguintes critérios foram reunidos: a) um aumento no VO_2 menor que $2,1 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ entre os dois últimos estágios, b) a razão de troca respiratória maior que 1,1; c) $\geq 90\%$ da frequência cardíaca máxima predita pela idade ($220 - \text{idade}$) (HOWLEY et al., 1995). Na ausência da ocorrência de tais fatores, o VO_2max foi determinado como o maior valor obtido ao final do teste ($\text{VO}_{2\text{pico}}$). O limiar ventilatório (LV) e o ponto de compensação respiratória (PCR) foram determinados de maneira independente por dois pesquisadores experientes como: o ponto de perda de linearidade da relação VE / VO_2 (LV) e o ponto de perda de linearidade da relação VE / VCO_2 associado ao primeiro aumento na fração de CO_2 expirada (PCR) (MEYER et al., 2005). Em caso de discordância, um terceiro pesquisador foi consultado. O LV e o PCR foram utilizados na determinação das intensidades dos testes de cargas constantes.

4.5 Medidas cardiovasculares

Durante as sessões experimentais, foram utilizadas como medidas de função do sistema cardiovascular a frequência cardíaca (FC), a qual foi utilizada também para estimativa da ventilação em litros por minuto (VE), a pressão arterial (PA) sistólica e diastólica e a variabilidade da frequência cardíaca (VFC). A FC foi monitorada durante todo o período dos testes, assim como a VFC, através da utilização de um cardiófrequencímetro (Polar S810; Kempele, Finland). A PA foi aferida com a utilização de um aparelho automático de pressão arterial de mesa prata BPA100-Microlife®. O registro da VFC foi realizado em janelas de 10 minutos em repouso com o participante sentado (pré-exercício) e durante o exercício. O cardiófrequencímetro utilizado permite a mensuração do intervalo temporal entre as sístoles ventriculares (R-R), assim como parâmetros extraídos a partir dessa medida, com uma frequência de aquisição de 250 Hz extrapolada para 1000 Hz. O tratamento dos dados da VFC

foi realizado no domínio do tempo e da frequência utilizando o software Kubios HRV (Versão 2.0, Finlândia) (TARVAINEN et al., 2014).

4.6 Estimativa da ventilação através da frequência cardíaca

A VE foi estimada através da FC utilizando relações empíricas determinadas previamente por Zuurbier et al. (2009) através da equação:

$$VE = \exp (c + m * FC) \quad (\text{Equação 1})$$

na qual VE é a ventilação ($L \cdot \text{min}^{-1}$) estimada, FC é a frequência cardíaca, c é o intercepto da equação (1,03 para homens) e m é a inclinação da equação (0,021 para homens).

4.7 Coletas sanguíneas e preparação das amostras

Foram realizadas coletas sanguíneas por profissionais capacitados em todas as sessões experimentais, com exceção do TPE e da familiarização. O sangue foi coletado da veia braquial por um médico especializado em medicina esportiva e mantido em temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos também em temperatura ambiente para obtenção do soro. O soro obtido foi então aliquotado e armazenado a -80°C para posterior análise.

4.8 Análise das citocinas sanguíneas

As amostras de plasma foram preparadas para análise numa placa de 96 poços utilizando um painel de grânulos magnéticos de 13 citocinas/quimiocinas humanas personalizadas Milliplex MAP (Millipore Corp., Billerica, MA) seguindo os protocolos especificados pelo fabricante. Os analitos foram quantificados utilizando um instrumento de teste analítico Magpix, que utiliza a tecnologia xMAP (Luminex Corp., Austin, TX) e o software xPONENT 4.2 (Luminex). A tecnologia xMAP usa microesferas magnéticas codificadas por fluorescência revestidas com anticorpos de captura específicos de analitos para medir simultaneamente múltiplos analitos em uma amostra. Depois que as microesferas capturaram os analitos, um anticorpo de detecção biotinizado liga-se a esse complexo. A estreptavidina PE liga-se então como uma molécula marcadora. Dentro do instrumento, os grânulos magnéticos são mantidos em uma monocamada por um ímã, onde dois LEDs são usados para excitar o corante de microesfera interna e o corante da molécula marcadora, respectivamente. Uma câmera CCD captura essas imagens, que são analisadas pelo software

Milliplex Analyst (Millipore). As concentrações das citocinas (pg.mL^{-1}) foram determinadas com base em um ajuste de curva padrão de intensidade de fluorescência *versus* pg.mL^{-1} (ou ng.mL^{-1}).

4.9 Análise dos metabólitos sanguíneos

Previamente à análise dos metabólitos no sangue, filtros 3kDa (Amicon Ultra) foram lavados com o intuito de obter o branco amostral. Foram utilizados 500 μL de H_2O Milli-Q aplicados ao filtro, com posterior centrifugação a 14.000 rpm, durante 10 minutos em temperatura de 4°C . Este processo foi repetido cinco vezes devido a resultados anteriores terem mostrado eliminação total do glicerol do filtro. Após a quinta lavagem, foi realizado um *spin* com inversão do filtro e rotação de 8.000 rpm por 5 segundos para eliminar qualquer resíduo de H_2O Milli-Q. Após o *spin*, foram adicionados ao filtro 350 μL de amostra de soro, a qual foi centrifugada a 14.000 rpm por 45 minutos a 4°C . Após a centrifugação, foram recuperados 200 μL do soro filtrado. Ao soro foram então adicionados 60 μL de um tampão fosfato (Fosfato de Sódio Monobásico, NaH_2PO_4 H_2O -137,99 g.mol^{-1} ; Fosfato de Sódio Dibásico, Na_2HPO_3 - 141,96 g.mol^{-1}) (padronização do pH), TSP ((ácido 3-(trimetil-silil)-2,2',3,3' tetrauteropropiônico ou TMSP-d4, a 50 mmol.L^{-1} em D_2O (6,06 μL) (referência interna) e 340 μL de H_2O Milli-Q.

4.10 Aquisição do espectro e identificação dos metabólitos

Os espectros foram adquiridos utilizando um espectrômetro de RMN Inova Agilent (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EUA). A RMN operou a uma frequência de ressonância de ^1H 600 MHz e temperatura constante de 298 K (25°C). Um total de 256 decaimentos de indução livre foi realizado. A fase espectral e as correções de base, assim como a identificação e quantificação dos metabólitos presentes nas amostras, foram realizadas utilizando o software Suite 7.6 Chenomx RMN (Chenomx Inc., Edmonton, AB, Canada). Para inibir qualquer viés tendencioso, as amostras foram perfiladas aleatoriamente.

4.11 Busca de vias metabólicas na análise do metaboloma

O estudo do metaboloma exige uma ampla interação entre vias metabólicas para que se considere da melhor maneira as relações biológicas dos metabólitos obtidos. É comum a utilização de plataformas online e softwares para, além das análises estatísticas, determinação das vias alteradas. Porém, durante a análise dos dados da presente tese, a busca por uma única ferramenta digital sempre resultou em uma análise incompleta das possibilidades,

principalmente de interação entre os metabólitos. Por esse motivo, as funções e interações dos metabólitos selecionados pelo VIP (*Variable Importance in Projection*) score foram realizadas através dos seguintes passos: 1) busca e reconhecimento do metabólito no site da *Human Metabolome Database* (<http://www.hmdb.ca/>); 2) reconhecimento das vias nas quais o metabólito está envolvido no site da *Small Molecule Pathway Database* (<http://smpdb.ca/>); 3) estudo das vias no livro *Princípios de Bioquímica de Lehninger* (NELSON; COX, 2014) e; 4) busca de artigos na base de dados PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) para identificação de artigos recentes sobre a via e possíveis implicações na saúde.

4.12 Local de realização das coletas de dados

As sessões experimentais foram realizadas em um contêiner capaz de filtrar o ar atmosférico, simulando assim um ambiente limpo sem alterações perceptíveis. Isso permitiu que o estudo fosse conduzido de maneira vendada, ou seja, os participantes não receberam informações acerca do ambiente (poluído e limpo) antes do término do estudo. O contêiner está localizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, próximo à esquina da rua Teodoro Sampaio com a avenida Dr. Arnaldo, onde é frequente o intenso tráfego de veículos. Dessa forma, o ambiente poluído na sala de testes era realizado com a simples entrada do ar ambiente. Para caracterização do ambiente com ar filtrado, o ar do ambiente externo passava por uma série de filtros HEPA (do inglês *High Efficiency Particulate Arrestance*) para retenção das partículas em suspensão e de filtros biológicos para detenção dos gases poluentes. Uma representação esquemática do contêiner está representada na figura 8. Uma melhor visualização acerca do funcionamento e da localização do contêiner pode ser obtida a partir de um pequeno vídeo disponível na internet no endereço: https://www.youtube.com/watch?v=Au7yal_SF0Y.

Figura 8. Representação esquemática do contêiner onde foram realizadas as coletas de dados.

4.13 Análise dos poluentes atmosféricos

Em todas as sessões experimentais a concentração dos poluentes atmosféricos foi determinada. A mensuração do PM foi continuamente realizada por dois analisadores Dust Track Aerosol Monitor 8530 (TSI Incorporated, Shoreview, MN, USA), para a determinação das concentrações de $PM_{2,5}$ e PM_{TOTAL} em suspensão. As concentrações dos óxidos de nitrogênio (NO_x) foram mensuradas continuamente por um analisador modelo 42i (Thermo Fisher Scientific, Franklin, MA, USA). A temperatura e a umidade relativa do ar foram obtidas durante todas as sessões experimentais através de um termohigrômetro digital de mesa (Incoterm, Porto Alegre, Brasil).

4.14 Caracterização da amostra

A tabela 2 apresenta a idade, variáveis antropométricas e as variáveis fisiológicas mensuradas no teste progressivo até a exaustão e o escore obtido no IPAQ.

Tabela 2. Idade, variáveis antropométricas, variáveis fisiológicas e IPAQ (n = 10).

	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Idade (anos)	25,9 ± 2,2	22	28
Estatura (cm)	174,9 ± 9,7	163	187
Massa corporal (kg)	72,7 ± 8,9	59,3	85,4
FCmax (bpm)	182 ± 11	175	198
VO ₂ max (mL.kg ⁻¹ .min. ⁻¹)	42,15 ± 8,3	35,4	50,5
LV (Watts)	150 ± 15	130	160
PCR (Watts)	260 ± 15	250	280
IPAQ (escore)	1365 ± 217	1247	1465

Os valores estão apresentados como médias ± desvios-padrão, assim como os valores mínimos e máximos observados. FCmax: frequência cardíaca máxima; VO₂max: consumo máximo de oxigênio; LV: limiar ventilatório; PCR: ponto de compensação respiratória; IPAQ: *International Physical Activity Questionnaire*.

5 Estudo 1: Análise da influência da duração do exercício realizado em ambiente com poluição atmosférica sobre o sistema cardiovascular, inflamação e metabóloma

5.1 Introdução

O controle da poluição atmosférica tem sido um grande desafio à saúde pública, principalmente em grandes cidades, as quais concentram uma grande quantidade de pessoas próximas a fontes poluentes, como indústrias e grandes frotas de automóveis (CHEN; KAN, 2008). Nesses locais, os resíduos da queima de combustíveis fósseis, como os materiais particulados (PM) e o monóxido de carbono (CO), assim como o ozônio (O₃), são os principais poluentes atmosféricos capazes de atuar em vias biológicas e provocar efeitos nocivos à saúde (CUTRUFELLO et al., 2012; GILES; KOEHLE et al., 2014). Ao conduzirem um estudo com modelo animal, Suwa et al. (2002) observaram aumento da fração da luz do vaso ocupada por placas de aterosclerose após exposição ao PM₁₀ ($33,3 \pm 4,6\%$) comparado ao ambiente limpo ($19,5 \pm 3,1\%$). Além disso, Magari et al. (2001) observaram, após exposição ao PM_{2,5}, um decréscimo médio de 2,66% no desvio-padrão dos intervalos RR, um índice da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) capaz de representar perturbações no controle autonômico da função cardiovascular. Em conjunto, esses estudos sugerem que a poluição atmosférica pode afetar negativamente o sistema cardiovascular..

A realização de exercícios físicos parece ser um dos fatores capazes de maximizarem os efeitos agudos da poluição atmosférica em nosso organismo (GILES; KOEHLE, 2014). Sabe-se que o exercício físico aumenta a ventilação minuto (GILES; KOEHLE, 2014) e a participação da respiração oral (ORAVISJARVI et al., 2011), resultando em uma maior inalação de poluentes no mesmo período de exposição. Nyhan et al. (2014) observaram que aqueles indivíduos que se locomoviam de maneira ativa (pedestres e ciclistas) apresentavam uma maior deposição alveolar de PM_{2,5} e PM₁₀ comparados àqueles que se transportavam de maneira passiva (passageiros de ônibus e trem), reforçando a ideia do aumento dos efeitos da poluição com a realização de exercícios. De fato, um número considerável de estudos tem demonstrado resultados que corroboram os achados de Nyhan et al. (2014) (SHARMAN et al., 2004; KARGARFARD et al., 2011; FLOURIS et al., 2012). Por exemplo, Avol et al. (1983) observaram que 1 hora de exercício moderado em ambiente com concentração média de PM de $196 \mu\text{g.m}^{-3}$ resultou em uma redução significativa de parâmetros da função pulmonar. Semelhantemente, foi observada uma maior chance de isquemia cardíaca durante o exercício submáximo em exposição ao PM_{2,5} comparado ao ar limpo (razão de chances: 1,53;

$p < 0,05$) (LANKI et al., 2006), assim como um maior decréscimo na VFC durante o exercício em ambiente poluído (NYHAN et al., 2014), sugerindo um maior estresse cardiovascular durante o exercício em ambiente poluído.

Contudo, apesar dos resultados prévios sugerirem que os poluentes atmosféricos são capazes de atuar em diferentes vias biológicas, a maioria dos estudos tem se concentrado em marcadores inflamatórios e alguns parâmetros de estresse oxidativo (TASKIRAN et al., 2007; JOMOVA; VALKO, 2011; BRUCKER et al., 2015). Por exemplo, Brucker et al. (2013) observaram maiores concentrações sanguíneas de IL-6 ($155,95 \pm 6,33 \text{ pg.mL}^{-1}$), TNF- α ($177,13 \pm 7,50 \text{ pg.mL}^{-1}$) e menores concentrações de IL-10 ($61,46 \pm 2,08 \text{ pg.mL}^{-1}$) em taxistas frequentemente expostos à poluição comparados a indivíduos menos expostos ($119,32 \pm 16,60 \text{ pg.mL}^{-1}$, $144,40 \pm 14,91 \text{ pg.mL}^{-1}$ e $102,70 \pm 8,12 \text{ pg.mL}^{-1}$, respectivamente; $p < 0,05$), apontando para um maior nível inflamatório nos taxistas. Dessa maneira, ainda é desconhecido o impacto da duração do exercício realizado em ambiente poluído sobre o perfil metabólico geral. A determinação do perfil metabólico é capaz de fornecer um estado global e identificar diversos metabólitos que podem representar diferentes vias de uma extensa e complexa rede metabólica, a qual pode fornecer respostas interessantes acerca da realização de exercício em ambiente poluído (RYAN; ROBARDS, 2006). Além disso, parece também importante que se conheça a resposta da VFC ao exercício em ambiente poluído, por esta poder representar o estresse imposto ao sistema cardiovascular (MCCRATY; SHAFFER, 2015) e possuir uma mensuração fácil e de baixo custo.

Dessa forma, uma vez que tanto o período de exposição (MCCONNELL et al., 2002; PETERS et al., 2004) quanto a realização de exercícios (CUTRUFELLO et al., 2012; GILES; KOEHLE, 2014; NYHAN et al., 2014) são capazes de aumentar agudamente os efeitos da poluição sobre o organismo, é plausível suspeitar que a duração do exercício em ambiente poluído seja também capaz de afetar a quantidade de poluentes inalados e, conseqüentemente, os efeitos da poluição nas vias biológicas. Portanto, o objetivo do presente estudo será avaliar se o perfil metabólico e o estresse cardiovascular resultantes da exposição à poluição atmosférica podem ser influenciados pela duração do exercício. Nossa hipótese é que uma maior duração de exercício irá resultar em uma maior inalação de poluentes, alterando em uma maior magnitude os parâmetros cardiovasculares, inflamatórios e o metaboloma.

5.2 Metodologia específica

5.2.1 Desenho experimental

A figura 1 demonstra a representação esquemática do desenho experimental (painel A) assim como de uma única sessão experimental (painel B). Ao todo, foram realizadas 3 sessões, sendo: 1) medidas antropométricas e teste progressivo até a exaustão voluntária para caracterização da amostra e determinação da intensidade dos testes de carga constante; 2 e 3) dois testes de carga constante em intensidade moderada em ambiente limpo e poluído. As sessões 2 e 3 foram contrabalançadas entre si. Os participantes foram instruídos a não realizarem exercícios vigorosos nas 24 horas precedentes às sessões experimentais. Foi dado um intervalo mínimo de 48 horas entre as sessões.

Figura 1. Representação esquemática do desenho experimental (painel A) e de uma única sessão (painel B). O quadro em cinza representa a sessão experimental realizada em ambiente poluído. TPE: teste progressivo até a exaustão voluntária. No quadro A, as foram 2 e 3 serão randomizadas. No quadro B, as setas indicam os momentos de coleta de sangue, da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da percepção subjetiva de esforço (PSE).

5.2.2 Testes de cargas constantes

Nas sessões 2 e 3 os participantes realizaram dois testes de cargas constante, sendo um em ambiente limpo e um em ambiente poluído, de forma contrabalançada. Os testes tiveram duração de 90 minutos e a intensidade escolhida para esses testes foi igual a 25% da diferença entre o LV e o PCR. Essa intensidade foi determinada em um estudo piloto realizado

previamente, sendo a maior intensidade que poderia ser mantida durante 90 minutos sem desconforto excessivo. Em ambos os testes, foi realizado um aquecimento sem carga com duração de 5 minutos a 60 rpm. Após o aquecimento, a intensidade foi ajustada para o teste. Coletas sanguíneas para análise do metaboloma e das citocinas e da percepção subjetiva de esforço foram obtidas pré, com 30, 60 e logo após os 90 minutos de exercício. A VFC foi analisada em janelas de 10 minutos antes do início do exercício, em 30, 60 e 90 minutos de exercício, assim como após o término do teste. A PA foi mensurada nos momentos pré e logo após o término dos testes.

5.2.3 Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk. A comparação da concentração média de PM_{2,5}, PM_{TOTAL}, NO e NO₂, assim como dos valores de temperatura, umidade relativa do ar, FC e VE entre as sessões 2 e 3 foi realizada através de um teste T de *Student* para dados não-pareados. Os valores de PSE mensurados nos momentos 30, 60 e 90 minutos foram comparados através de uma ANOVA de medidas repetidas de dois caminhos (momento x ambiente). Os valores de PA sistólica e diastólica foram expressos como deltas (pós – pré) e comparados através de um teste T de *Student* para dados pareados. Os parâmetros da VFC foram comparados através de uma ANOVA de medidas repetidas de dois caminhos (momento x ambiente). Devido à natural grande diferença nas concentrações das citocinas sanguíneas avaliadas, para fins de facilitação da comparação, as concentrações das obtidas foram expressas como fold changes (pós/pré). Essa transformação permite uma melhor comparação do comportamento das citocinas no tempo, nos diferentes ambientes e entre as demais. Os valores de fold-change foram comparados através de uma ANOVA de medidas repetidas de dois caminhos (momento x ambiente). Para as ANOVAS realizadas, foi utilizada a correção de *Bonferroni*. Todas as análises foram conduzidas com a utilização do software estatístico SPSS (versão 17.0, SPSS INC., Chicago, IL, USA), e o nível de significância adotado para todas as análises foi $\alpha = 0.05$.

Para os metabólitos sanguíneos, inicialmente foi utilizada uma análise de componentes principais (PCA). Este tipo de análise proporciona uma rápida visualização das semelhanças ou diferenças no conjunto de dados dos metabólitos (SUMMER, 2003). Posteriormente, foi empregada uma Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), a qual permite a distinção entre os grupos de metabolomas. Para validação dessa análise, foram utilizados os índices Q² (previsibilidade do modelo) e R² (variância explicada). A discriminação dos perfis metabólicos entre os ambientes foi realizada utilizando-se o escore

VIP (*Variable Importance in Projection*) superior a 1,0 (Xia et al. 2015), proveniente da própria PLS-DA. Esse escore permite selecionar os metabólitos que mais contribuíram para a diferença dos metabolomas entre os ambientes nos momentos 30, 60 e 90 minutos de exercício. Esses procedimentos relativos às análises do metaboloma foram conduzidos utilizando o sistema MetaboAnalyst (www.metaboanalyst.ca), o qual permite realizar várias análises relativas a dados extraídos da análise de metabolômica. Essa é uma ferramenta grátis, de fácil utilização e sem necessidade de *download* (XIA et al., 2015).

5.3 Resultados

5.3.1 Concentração dos poluentes

A comparação das concentrações de $PM_{2,5}$, PM_{TOTAL} , NO e NO_2 entre os ambientes limpo e poluído está representada na figura 2. Para todos os poluentes analisados, a concentração foi significativamente maior no ambiente poluído comparado ao limpo ($p < 0,05$).

Figura 2. Concentração dos poluentes por ambiente. $PM_{2,5}$: material particulado com diâmetro de 2,5 μm ou menor; PM_{TOTAL} : material particulado total. NO: óxido de nitrogênio; NO_2 : dióxido de nitrogênio. * Significativamente maior comparado ao mesmo poluente no ambiente limpo ($p < 0,05$).

5.3.2 Temperatura e umidade relativa do ar

A tabela 1 apresenta a temperatura e a umidade relativa do ar durante as sessões de exercício nos ambiente limpo o poluído. Não houve diferença significativa entre as sessões.

Tabela 1. Temperatura e umidade relativa do ar durante as sessões em ambiente limpo e poluído.

	Limpo	Poluído
Temperatura (°C)	20,8 ± 0,5	20,3 ± 0,6
Umidade relativa do ar (%)	71 ± 3	70 ± 3

Os dados estão apresentados como médias ± desvios-padrão.

5.3.3 Frequência cardíaca e ventilação

A ventilação foi estimada através da frequência cardíaca, semelhantemente ao realizado por Nyhan et al. (2014), durante os exercícios em ambos os ambientes. Não houve diferença significativa entre os ambientes limpo e poluído para nenhum dos dois parâmetros (figura 3).

Figura 3. Frequência cardíaca (painel A) e ventilação estimada (painel B) por ambiente.

5.3.4 Percepção subjetiva de esforço

A percepção subjetiva de esforço, determinada através da escala de Borg (BORG, 1988), foi reportada com 30, 60 e 90 minutos de exercício (figura 4). A percepção subjetiva de esforço aumentou significativamente ao longo do exercício em ambos os ambientes ($p < 0,05$). Contudo, não houve diferença para o mesmo momento nos diferentes ambientes.

Figura 4. Percepção subjetiva de esforço com 30, 60 e 90 minutos de exercício por ambiente.

5.3.5 Pressão arterial

Os valores da pressão arterial sistólica e diastólica foram mensurados nos momentos pré e logo após os 90 minutos de exercício e estão apresentados na figura 5 como a diferença entre a medida pós e a medida pré (delta). No ambiente poluído, tanto o delta da pressão sistólica quanto da pressão diastólica foram significativamente maiores quando comparados aos do ambiente limpo.

Figura 5. Delta da pressão arterial sistólica e diastólica por ambiente. * Significativamente maior comparado ao ambiente limpo ($p < 0,05$).

5.3.6 Variabilidade da frequência cardíaca

A variabilidade da frequência cardíaca foi mensurada durante toda a duração de cada teste. Para as análises, foram selecionadas janelas de 10 minutos nos momentos pré-exercício, 20-30, 50-60 e 80-90 minutos de exercício e logo após o término do exercício. Não foram observadas diferenças significativas para nenhum dos momentos entre os ambientes limpo e poluído (tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca nos diferentes momentos por ambiente (n = 10).

	Limpo				
	pré	30	60	90	Pós
Média RR	918,8 ± 125,9	473,4 ± 65,3	477,9 ± 70,1	466,5 ± 72,7	779,7 ± 124,5
SDNN	85,1 ± 26,2	12,7 ± 4,8	12,8 ± 4,9	12,8 ± 7,0	66,6 ± 26,8
RMSSD	61,0 ± 24,9	4,6 ± 1,7	4,8 ± 2,4	5,0 ± 3,0	32,7 ± 16,0
pNN50	35,1 ± 18,7	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,1	18,7 ± 13,5
LF	1867,0 ± 1321,4	43,4 ± 56,7	46,6 ± 61,2	64,8 ± 118,8	1392,5 ± 1012,9
HF	1275,5 ± 1019,7	5,6 ± 7,6	7,2 ± 9,4	8,4 ± 12,4	579,7 ± 479,6
LF/HF	1,8 ± 1,1	9,0 ± 5,4	8,5 ± 6,1	8,6 ± 4,4	3,5 ± 2,6
SD1	43,2 ± 17,6	3,3 ± 1,2	4,4 ± 3,6	3,5 ± 2,1	27,1 ± 12,1
SD2	111,9 ± 33,6	17,6 ± 6,9	17,7 ± 6,7	17,7 ± 9,7	90,0 ± 36,5
	Poluído				
	pré	30	60	90	Pós
Média RR	942,7 ± 164,0	527,6 ± 119,0	474,3 ± 71,5	467,9 ± 70,5	756,8 ± 183,0
SDNN	75,6 ± 29,4	21,5 ± 24,2	13,5 ± 6,6	13,0 ± 8,2	69,2 ± 33,6
RMSSD	59,2 ± 40,2	9,4 ± 13,1	4,8 ± 3,5	4,6 ± 3,7	39,1 ± 20,9
pNN50	30,5 ± 22,0	2,8 ± 8,4	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,1	18,3 ± 15,2
LF	1371,3 ± 991,6	245,7 ± 574,0	41,6 ± 81,6	58,1 ± 119,9	1115,33 ± 628,3
HF	1450,0 ± 2059,0	9,3 ± 15,2	9,0 ± 15,4	7,8 ± 12,7	622,0 ± 633,7
LF/HF	2,3 ± 2,6	7,3 ± 3,6	7,2 ± 3,6	8,6 ± 4,6	4,8 ± 5,5
SD1	41,9 ± 28,5	6,6 ± 9,3	3,4 ± 2,5	3,3 ± 2,6	27,6 ± 14,8
SD2	97,9 ± 33,3	29,7 ± 33,0	18,8 ± 9,0	18,1 ± 11,3	93,6 ± 45,7

Os valores estão apresentados como médias ± desvios-padrão.

5.3.7 Citocinas

A concentração sanguínea das citocinas foi mensurada nos momentos pré, aos 30 e 60 minutos de exercício e logo após o término do exercício. Na tabela 3 estão apresentados os valores de fold change nos momentos 30, 60 e pós em relação ao pré. Após os 90 minutos de exercício no ambiente poluído, os valores de IL-6 ($p = 0,047$) e VEGF ($p = 0,026$) foram significativamente maiores comparados ao ambiente limpo. Também após 90 minutos no ambiente poluído, a concentração de IL-10 apresentou uma tendência estatística ($p = 0,061$) de ser menor em relação ao ambiente limpo.

Tabela 3. Fold change das interleucinas sanguíneas nos diferentes momentos por ambiente (n = 10).

	Limp			Poluído		
	30	60	90	30	60	90
IL-6	$0,80 \pm 0,49$	$1,16 \pm 0,42$	$4,71 \pm 2,42$	$1,05 \pm 0,27$	$1,14 \pm 0,28$	$6,46 \pm 3,58^*$
TNF- α	$0,68 \pm 0,46$	$1,09 \pm 0,58$	$53,66 \pm 33,30$	$1,13 \pm 0,57$	$1,69 \pm 1,41$	$69,84 \pm 38,15$
IL-1	$1,24 \pm 1,11$	$1,10 \pm 0,69$	$19,79 \pm 14,31$	$1,11 \pm 0,91$	$1,38 \pm 0,79$	$18,67 \pm 15,87$
VEGF	$1,45 \pm 1,41$	$2,29 \pm 1,78$	$2,95 \pm 1,93$	$1,11 \pm 0,81$	$0,99 \pm 0,55$	$10,55 \pm 6,17^*$
MCP1	$6,91 \pm 3,31$	$40,96 \pm 34,05$	$730,48 \pm 614,768$	$10,44 \pm 7,62$	$37,82 \pm 35,18$	$1158,84 \pm 738,19$
MIP1	$2,70 \pm 5,94$	$3,05 \pm 5,26$	$41,56 \pm 52,05$	$1,23 \pm 1,04$	$4,25 \pm 3,13$	$66,43 \pm 111,92$
IL-10	$0,71 \pm 0,43$	$1,10 \pm 0,57$	$14,97 \pm 7,62$	$0,83 \pm 0,26$	$1,18 \pm 0,32$	$9,85 \pm 5,13^{**}$

Os valores estão apresentados como médias $\pm$ desvios-padrão do fold change em relação ao momento pré; *significativamente maior comparado ao mesmo momento no ambiente limpo ($p < 0,05$); ** tendência estatística de significância ($p = 0,061$).

5.3.8 Análise exploratória do metaboloma

Previamente às análises estatísticas dos dados do metaboloma, os dados foram normalizados através da técnica de Pareto scaling, a qual consiste em uma centralização pela média e divisão pela raiz quadrada do desvio-padrão de cada variável. A figura 6 mostra um exemplo da alteração nos dados após a normalização.

Figura 6. Comportamento e boxplot dos dados após o processo de normalização.

5.3.9 Efeitos de 30 minutos de exercício

A análise de PCA não identificou a presença de *outliers* (figura 7). Considerando-se os intervalos de confiança, nenhuma amostra foi retirada das análises posteriores. Em conjunto, os dois componentes principais selecionados pela análise explicam 38,6% da variância dos dados.

Figura 7. Análise de PCA do perfil metabolômico após 30 minutos de exercício por ambiente. Δ perfis metabolômicos em ambiente limpo; + perfis metabolômicos em ambiente poluído.

A figura 8 mostra a distribuição dos perfis metabolômicos de acordo com o ambiente aos 30 minutos de exercício após a realização da análise de PLS-DA. É possível observar distribuições distintas dos perfis metabólicos nos ambientes limpo e poluído. A análise de PLS-DA apresentou acurácia de 0,25, R^2 de 0,66 e Q^2 1,1.

Figura 8. Análise de PLS-DA do perfil metabolômico após 30 minutos de exercício por ambiente. ○ perfis metabolômicos em ambiente limpo; ● perfis metabolômicos em ambiente poluído.

Foram selecionados 15 metabólitos com valor de VIP score superior a 1. Na tabela 4 estão apresentados os metabólitos selecionados, os valores de VIP score e os valores de p das comparações das concentrações desses metabólitos entre os ambientes limpo e poluído em 30 minutos de exercício.

Tabela 4. Metabólitos selecionados na análise de PLS-DA como mais capazes de diferenciar o metaboloma em ambiente limpo e poluído aos 30 minutos de exercício (n = 10).

Metabólito	VIP score	Fold change		Principal	Vias	
		Limpo	Poluído		Principal	Específica
Isoleucina	2,1	1,03	0,87	Aminoácidos	Metabolismo de valina, leucina e isoleucina	
Glutamina	1,8	0,81	0,99		Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato	
Metionina	1,7	0,83	0,58		Metabolismo de cisteína e metionina	
Ornitina	1,6	1,07	0,43		Ciclo da ureia	
2-hidroxibutirato	1,5	1,03	0,79		Metabolismo de metionina, cisteína e taurina	
Malonato	1,5	0,53	0,71		Metabolismo de glicina, serina e treonina	
Metilsuccinato	1,3	1,11	0,93		Metabolismo de metionina, cisteína e taurina	
Treonina	1,1	0,78	0,94		Metabolismo de glicina, serina e treonina	
3-hidroxi-3-metilglutarato	1,5	4,41	2,40		Metabolismo de mevalonato	
Fosfocolina	1,5	1,39	1,01	Lipídios	Metabolismo de fosfolipídios	
Acetona	2,1	0,59	0,95		Metabolismo de corpos cetônicos	
Succinato	1,1	1,91	1,41	Energético	Ciclo do ácido tricarboxílico	
4-Piridoxato	2,0	0,66	7,77		Álcoois e polióis, aminas, Aromáticos, Vitaminas e cofatores	
Dimetil Sulfona	1,8	1,24	0,78	Componentes sulfurados	#N/D	
2-metilglutarato	1,4	0,97	0,66		#N/D	

Os valores de VIP score são apresentados sem unidade; os valores de fold change se referem ao valor da concentração de cada metabólito no momento 30 dividido pela concentração pré-exercício. #N/D: não consta na base HMDB.

5.3.10 Efeitos de 60 minutos de exercício

Após a análise de PCA para 60 minutos de exercício em ambiente limpo e poluído, todas as amostras foram mantidas para as análises subsequentes (figura 9). Em conjunto, os dois componentes principais selecionados pela análise explicam 34,7% da variância dos dados.

Figura 9. Análise de PCA do perfil metabolômico após 60 minutos de exercício por ambiente. Δ perfis metabolômicos em ambiente limpo; + perfis metabolômicos em ambiente poluído.

De acordo com a análise de PLS-DA para 60 minutos de exercício, é possível observar distribuições distintas dos perfis metabolômicos nos ambientes limpo e poluído. A análise de PLS-DA apresentou acurácia de 0,25, R^2 de 0,81 e Q^2 1,0 (figura 10).

Figura 10. Análise de PLS-DA do perfil metabolômico após 60 minutos de exercício por ambiente. ○ perfis metabolômicos em ambiente limpo; ● perfis metabolômicos em ambiente poluído.

Foram selecionados 15 metabólitos com valor de VIP score superior a 1, os quais estão apresentados na tabela 5, juntamente com os valores de VIP score e os valores de p das comparações das concentrações desses metabólitos entre os ambientes limpo e poluído em 60 minutos de exercício.

Tabela 5. Metabólitos selecionados na análise de PLS-DA como mais capazes de diferenciar o metaboloma em ambiente limpo e poluído aos 60 minutos de exercício (n = 10).

Metabólito	VIP score	Fold change		Vias	
		Limpo	Poluído	Principal	Específica
3-hidroxiisovalerato	1,86	1,30	0,90	Aminoácidos	Metabolismo de leucina, isoleucina e valina
2-hidroxibutirato	1,77	1,43	0,92		Metabolismo de metionina, cisteína e taurina
Isoleucina	1,75	1,26	0,99		Metabolismo de leucina, isoleucina e valina
Metilsuccinato	1,58	1,28	1,00		Metabolismo de leucina, isoleucina e valina
Glutamina	1,58	0,86	0,96		Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato
Guanidoacetato	1,44	1,23	0,89		Metabolismo da creatina
Ornitina	1,43	1,00	0,61		Ciclo da ureia, Metabolismo de arginina e prolina
Malonato	1,31	2,09	2,63		Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato
Creatina	1,05	1,82	1,02		Metabolismo da creatina
Fosfocolina	1,20	1,36	1,07		Metabolismo de fosfolipídios
Acetoacetato	1,02	0,92	1,25	Lipídios	Metabolismo de corpos cetônicos
N-acetilglicosamina	1,79	0,80	0,94		#N/D
Melatonina	1,36	1,33	0,43	#N/D	#N/D
1,7-dimetilxantina	1,27	0,22	0,59		#N/D
Trimetilamina	1,17	1,03	1,22		#N/D

Os valores de VIP score são apresentados sem unidade; os valores de fold change se referem ao valor da concentração de cada metabólito no momento 60 dividido pela concentração pré-exercício. #N/D: não consta na base HMDB.

5.3.11 Efeitos de 90 minutos de exercício

A análise de PCA para 90 minutos de exercício em ambiente limpo e poluído também não indicou *outliers* (figura 11). Em conjunto, os dois componentes principais selecionados pela análise explicam 39% da variância dos dados.

Figura 11. Análise de PCA do perfil metabolômico após 90 minutos de exercício por ambiente. Δ perfis metabolômicos em ambiente limpo; + perfis metabolômicos em ambiente poluído.

A análise de PLS-DA apontou distinções significativas nos perfis metabolômicos entre os ambientes limpo e poluído após 90 minutos de exercício (figura 12). A análise de PLS-DA apresentou acurácia de 0,11, R^2 de 0,78 e Q^2 1,67.

Figura 12. Análise de PLS-DA do perfil metabolômico após 90 minutos de exercício por ambiente. ○ perfis metabolômicos em ambiente limpo; ● perfis metabolômicos em ambiente poluído.

Foram selecionados 14 metabólitos com valor de VIP score superior a 1, os quais estão apresentados na tabela 6, juntamente com os valores de VIP score e os valores de p das comparações das concentrações desses metabólitos entre os ambientes limpo e poluído em 90 minutos de exercício.

Tabela 6. Metabólitos selecionados na análise de PLS-DA como mais capazes de diferenciar o metaboloma em ambiente limpo e poluído aos 90 minutos de exercício (n = 10).

Metabólito	VIP score	Fold change		Principal	Vias
		Limpo	Poluído		Específica
Glutamina	2,55	0,74	0,94	Aminoácidos	Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato
Metilsuccinato	2,29	1,77	1,10		Metabolismo de leucina, isoleucina e valina
Metionina	1,59	0,94	0,67		Metabolismo de metionina e cisteína
2-hidroxibutirato	1,55	1,03	0,81		Metabolismo de metionina, cisteína e taurina
Creatina	1,42	1,89	1,00		Metabolismo da creatina
3-hidroxiisobutirato	1,22	0,84	0,87		Metabolismo de leucina, isoleucina e valina
Treonina	1,16	0,93	0,80		Metabolismo de glicina, serina e treonina
Histidina	1,16	2,97	4,53		Metabolismo da histidina
Acetilcolina	1,34	0,80	1,05	Lipídios	Metabolismo de glicerofosfolipídios
Carnitina	1,03	0,86	1,41		Metabolismo da carnitina
1,3-dimetilurato	1,20	0,93	0,80	Xenobióticos	Metabolismo da xantina
N-acetilcisteína	1,52	1,52	0,56		#N/D
Trimetilamina	1,41	0,96	1,04	#N/D	#N/D
5-aminolevulinato	1,23	1,70	1,10		#N/D

Os valores de VIP score são apresentados sem unidade; os valores de fold change se referem ao valor da concentração de cada metabólito no momento 90 dividido pela concentração pré-exercício. #N/D: não consta na base HMDB.

5.3.12 Metabólitos de diferenciação entre os ambientes para cada momento

Para fins de comparação, a tabela 7 traz reunidos os metabólitos VIP em cada um dos momentos, os quais foram responsáveis por diferenciar o metaboloma entre o ambiente limpo e poluído.

Tabela 7. Principais metabólitos responsáveis pela diferenciação do metaboloma no ambiente poluído em comparação ao ambiente limpo em cada momento.

Aumentados		
30	60	90
Glutamina	Glutamina	Glutamina
Malonato	Malonato	Histidina
Treonina	Acetoacetato	Acetilcolina
Acetona	N-actilglicosamina	Carnitina
4-piridoxato	Trimetilamina	Trimetilamina
	1,7-dimetilxantina	
Diminuídos		
30	60	90
Isoleucina	Isoleucina	Metilsuccinato
2-hidroxi-3-metilglutarato	2-hidroxi-3-metilglutarato	2-hidroxi-3-metilglutarato
Metionina	Guanidoacetato	Metionina
Ornitina	Ornitina	Creatina
Metilsuccinato	Metilsuccinato	Treonina
3-hidroxi-3-metilglutarato	Creatina	1,3-dimetilurato
Fosfocolina	Fosfocolina	Aminolevulinato
Succinato	3-hidroxiisovalerato	N-acetilcisteína
Dimetilsulfona	Melatonina	3-hidroxiisobutirato
2-metilglutarato		

Os metabólitos estão separados entre os que se apresentaram aumentados ou diminuídos no ambiente poluído em relação ao ambiente limpo de acordo com o VIP score.

5.4 Discussão

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de comparar a influência de diferentes durações de exercício em ambiente limpo e poluído sobre parâmetros cardiorrespiratórios e o metaboloma. Estudos prévios têm demonstrado que a exposição à poluição atmosférica é capaz de afetar o sistema cardiorrespiratório em repouso (WHO, 2005; PEARCE et al., 2015) e durante o exercício (CUTRUFELLO et al., 2012; GILES; KOEHLE, 2014). Porém, nenhum estudo verificou se a duração do exercício poderia ser um fator importante para os efeitos da poluição sobre os sistemas biológicos, uma vez que os praticantes inalariam uma maior dose de poluentes em exercício mais prolongados. Nossos principais achados foram que, após o exercício em ambiente poluído, houve um aumento da PA, ao contrário do observado no ambiente limpo. Após 90 minutos de exercício, apenas no ambiente poluído, foi observado um aumento na concentração sanguínea de IL-6 e VEGF e diminuição na concentração sanguínea de IL-10, sugerindo um aumento na sinalização da inflamação. Por fim, a análise exploratória do metaboloma mostrou alterações interessantes em resposta ao ambiente poluído em cada um dos momentos analisados. Foi possível observar alterações persistentes ao longo dos diferentes momentos, as quais podem ser respostas metabólicas ao ambiente poluído independentes da duração do exercício. Por outro lado, algumas vias responderam ao ambiente poluído de uma maneira tempo-dependente, sendo distintas ao longo do período de exercício.

5.4.1 Qualidade do ar nas diferentes condições

Os resultados das concentrações dos poluentes durante as sessões experimentais sugerem que houve sucesso no controle de dois ambientes com níveis de poluição significativamente distintos. Levando-se em consideração as classificações da OMS sobre qualidade do ar quanto à poluição atmosférica (WHO, 2005), o ambiente limpo apresentou concentrações médias dos poluentes abaixo dos padrões recomendados ($PM_{2,5}$: 56%; PM_{TOTAL} : 68%; NO: 71%; NO_2 : 49%) . Analisando-se as concentrações observadas no ambiente poluído do presente estudo, é possível observar estudos prévios com ambientes poluídos com concentrações menores (PEKKANEN et al., 2002; JACOBS et al., 2010) e maiores (GILES et al., 2012; GILES et al., 2014). Nesse aspecto, duas importantes características devem ser destacadas: a) o ar do ambiente poluído era proveniente do ambiente encontrado externamente à sala de coleta, não havendo nenhuma manipulação e representando fielmente a qualidade do ar à qual os habitantes locais estão expostos: b) a

média dos poluentes encontra-se acima do recomendado pela OMS, caracterizando, de fato, esse ambiente como poluído. Dessa forma, é importante ressaltar que os achados do presente estudo se referem a um ambiente com alta validade ecológica e níveis de poluição não são considerados extremamente altos. Isso sugere que, possivelmente, valores de poluentes que não são considerados elevados são capazes de produzirem alterações em alguns parâmetros cardiovasculares, inflamatórios e metabólico durante o exercício predominantemente aeróbio.

5.4.2 Comportamento da ventilação, frequência cardíaca e percepção subjetiva de esforço

Diferentemente da hipótese inicial, a ventilação minuto estimada não foi alterada durante o exercício em ambiente poluído quando comparado ao limpo. Devido à maior concentração de poluentes no ar, nossa hipótese era de que seria necessária uma maior ventilação para suprir a demanda de oxigênio para o trabalho muscular do exercício. Além disso, era esperada uma maior resposta da ventilação devido à possível estimulação do centro respiratório em resposta a uma diminuição no pH sanguíneo (FERDINANDS et al., 2008). Por outro lado, os poluentes também são capazes de prejudicar a função pulmonar, como a diminuição no volume expiratório forçado e no volume tidal (GONG et al., 1986). Dessa forma, essas duas respostas poderiam estar se compensando, o que faz com que, apesar de um ambiente interno alterado, a variável resposta (VE) não apresente alteração, ao menos no intervalo de tempo analisado e para o nível de poluição avaliado. Deve-se destacar que as concentrações dos poluentes no ambiente poluído reportado no presente trabalho foram consideravelmente menores quando comparadas a estudos anteriores (GILES et al., 2012; WAUTERS et al., 2015). Por exemplo, segundo um relatório da OMS, são necessárias concentrações de NO₂ maiores que 1000 ppb para induzir alterações na função pulmonar de adultos saudáveis (WHO, 2005). Isso poderia estar também influenciando nos resultados observados.

Em relação à PSE, também não houve diferença significativa entre os ambientes em nenhum dos momentos analisados. Estudos prévios já demonstraram alterações em parâmetros perceptivos durante exercício realizados em ambiente poluído. Por exemplo, Schelegle e Adams (1986) recrutaram dez voluntários, os quais realizaram quatro testes máximos de 1 hora de ciclismo em ambientes com concentrações de ozônio de 0, 0,12, 0,18 e 0,24 ppm. Os autores observaram que, à medida que aumentou a concentração de ozônio, um número crescente de voluntários reportou não conseguir realizar esforço máximo. Porém, a PSE foi inicialmente proposta por sua correlação com fatores fisiológicos, como a própria FC

e a VE (BORG, 1988). Nesse sentido, seria inicialmente preciso que houvesse alterações nesses parâmetros fisiológicos para que a percepção de esforço fosse modificada. Então, o fato dessas variáveis fisiológicas não terem sido alteradas pode também explicar a ausência de diferença entre os ambientes na PSE. É possível que maiores níveis dos poluentes, ou mesmo a investigação em indivíduos mais susceptíveis aos efeitos da poluição, pudessem provocar respostas mais pronunciadas na PSE.

5.4.3 Variabilidade da frequência cardíaca

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros da VFC entre os ambientes limpo e poluído para nenhum dos momentos analisados. Esse achado é oposto ao encontrado em um considerável número de publicações que observaram alterações na VFC em ambiente com poluição atmosférica. Por exemplo, Gold et al. (2000) observaram associação negativa do SDNN e do RMSSD com a média diária de $PM_{2.5}$. Da mesma maneira, Magari et al. (2001) observaram uma diminuição de 2,66% no SDNN para cada aumento de 1 mg.m^{-3} de $PM_{2.5}$ na média de 4 horas de exposição. Por outro lado, também existem autores que não observaram relação entre a VFC e a poluição atmosférica. Buteau e Goldberg (2015) e (2016) revisaram os estudos que buscaram associar a VFC à poluição do ar. De maneira geral, apesar de grande parte das pesquisas ter demonstrado efeitos significativos da poluição sobre a VFC, principalmente no sentido de diminuição do SDNN (UNOSSON et al., 2013; NYHAN et al., 2014), os autores exploram também a grande disparidade metodológica entre elas, principalmente no que diz respeito à análise dos parâmetros de VFC. Por exemplo, enquanto Wheeler et al. (2006) e Suh e Zabonetti (2010) utilizaram os parâmetros da VFC transformados em log seguido de uma análise de modelo linear de efeitos mistos com diferentes covariáveis, Brauer et al. (2001) analisaram os parâmetros em valores brutos através de um modelo de efeitos fixos. Além das análises estatísticas, outro fator de confusão para a interpretação dos dados é o tipo de exposição dos indivíduos, podendo ser utilizada a exposição do indivíduo com aparelhos portáteis (SHIELDS et al., 2013) ou com a medição em um local fixo (HAMPEL et al., 2012). Além dos aspectos metodológicos, a realização de exercícios por si só aumenta a ativação do sistema nervoso simpático (ZOUHAL et al., 2008). Esse aumento ocorre em paralelo aos possíveis efeitos da poluição na regulação autonômica da VFC. Desse modo, a combinação de exercício e poluição atmosférica pode ser um fator de confusão para a análise da VFC.

Dois pontos são importantes merecem destaque em relação aos resultados da presente tese. Primeiramente, o nível de poluição observado no ambiente poluído foi

consideravelmente inferior quando comparado a alguns estudos prévios (GHIO et al., 2012; GILES et al., 2012). Como um de nossos objetivos era verificar as alterações biológicas provenientes da exposição aos níveis de poluição reais às quais os indivíduos estão expostos diariamente, não cabia manipular o ambiente para obter maiores concentrações, o que poderia aumentar nossas chances de observar resultados significativos na VFC. Em segundo lugar, os participantes do estudo eram todos residentes na cidade de São Paulo de regiões próximas e todos eram alunos da Universidade de São Paulo. Com isso, eles estavam expostos diariamente a níveis de poluição semelhantes e similares aos que foram observados no ambiente poluído. Isso também difere de estudos anteriores que utilizaram participantes que viviam em cidades com menores níveis de poluição (INT PANIS et al., 2010; AYDIN et al., 2014).

5.4.4 Alteração de pressão arterial no ambiente poluído

Os valores de PA após os 90 minutos de exercício foram significativamente maiores no ambiente poluído comparado ao ambiente limpo. Mais precisamente, a alteração da PA apresentou sentidos opostos nos dois ambientes. Enquanto no ambiente limpo houve um efeito hipotensor do exercício, com os valores pós ficando abaixo dos valores pré, no ambiente poluído tanto a pressão sistólica quanto a diastólica aumentaram. O efeito hipotensor do exercício aeróbio de baixa intensidade já era esperado, por ser um mecanismo bem conhecido, o qual já foi bem descrito por Kenney e Seals (1993). Por outro lado, também já foi demonstrado por diferentes estudos que a exposição à poluição do ar é capaz de aumentar a PA. Por exemplo, Bellavia et al. (2013) observaram aumentos significativos na PA sistólica (2,53 e 1,56 mmHg, respectivamente) e não-significativos na PA diastólica após 130 minutos de exposição em repouso a MP fino ($250 \mu\text{g.m}^{-3}$) e grosso ($200 \mu\text{g.m}^{-3}$).

Entre os mecanismos discutidos através dos quais a exposição à poluição pode levar a um aumento da PA estão alterações na biodisponibilidade de NO, devido a um maior estresse oxidativo, e uma maior ativação do sistema nervoso autônomo. Ambos podem aumentar o tônus vascular e aumentar o stiffness arterial (KUBESCH et al., 2015). De fato, tem sido reportado que a exposição aos poluentes atmosféricos é capaz tanto de promover o estresse oxidativo (BRUCKER et al., 2013) quanto de aumentar o stiffness arterial (LUNDBÄCK et al., 2009). Devido à ausência de alteração na ativação simpática, observada pela não diferença entre os ambientes na VFC, é possível sugerir que o aumento da PA possa estar ocorrendo pelo aumento do stiffness arterial das arteríolas musculares, principal local de controle da resistência vascular periférica (GUYTON; HALL, 2012). Apesar da análise do metaboloma

ter sido realizada com um intuito exploratório e de determinação do perfil, a concentração de arginina pode fornecer evidências sobre essa via, uma vez que esse aminoácido é o precursor da formação de NO, um potente vasodilatador. De fato, foi observado que as concentrações de arginina no sangue foram menores no ambiente poluído (30 min = 0,41 mg.dL⁻¹; 60 min = 0,48 mg.dL⁻¹; 90 min = 0,46 mg.dL⁻¹) em relação ao limpo (30 min = 0,68 mg.dL⁻¹; 60 min = 0,86 mg.dL⁻¹; 90 min = 0,78 mg.dL⁻¹) nos três momentos analisados. Desse modo, é possível sugerir que a poluição tenha aumentado a PA predominantemente através da menor formação de NO e, conseqüentemente, diminuição de seu efeito vasodilatador.

Com os nossos resultados, pode-se inferir que os efeitos de elevação na PA podem ocorrer em concentrações de poluentes mais baixas do que se considerava com os achados existentes antes da presente tese. Com isso, esse é um achado extremamente relevante, tendo em vista que a hipertensão é o maior fator de risco de morte no mundo segundo o *Global Health Risks Report* publicado pela OMS (WHO, 2009), e poderia ser um importante fator a ser considerado na recomendação das concentrações de poluentes.

5.4.5 Citocinas sanguíneas

Um dos objetivos centrais da presente tese foi avaliar se o comportamento de marcadores de inflamação seria diferente nos ambientes limpo e poluído e em qual momento seria possível observar essas diferenças. Diversos estudos prévios já demonstraram a ocorrência de um quadro de inflamação associado à exposição a poluentes atmosféricos (ARIS et al., 1993; BRUCKER et al., 2013). Contudo, com os dados existentes anteriormente, seria difícil estabelecer qual o tempo mínimo de exposição à poluição durante o exercício que seria necessário para que se observasse uma resposta pronunciada do quadro inflamatório. Nossos resultados mostraram aumentos significativos nas concentrações de IL-6 e VEGF e diminuição significativa na concentração de IL-10 após 90 minutos de exercício no ambiente poluído em relação ao limpo.

Considerando-se as concentrações das interleucinas, o aumento da IL-6 e a diminuição da IL-10 sugerem um aumento da resposta inflamatória no ambiente poluído. Sabe-se que a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória na quase totalidade dos tecidos do corpo (HUNTER; JONES, 2015), ao passo que a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória (AKDIS et al., 2016). Desse modo, a presença de poluentes pareceu levar a um quadro de inflamação sistêmica após o exercício. Nossos resultados se assemelham aos achados de Brucker et al. (2013), que verificaram que taxistas expostos à poluição durante o trabalho apresentavam níveis significativamente mais elevados de IL-6 ($155,95 \pm 6,33$ pg.mL⁻¹) e mais baixos de IL-10

($61,46 \pm 2,08 \text{ pg.mL}^{-1}$) comparados a indivíduos menos expostos à poluição ($119,32 \pm 16,60 \text{ pg.mL}^{-1}$ e $102,70 \pm 8,12 \text{ pg.mL}^{-1}$, respectivamente). Dessa forma, nossos dados mostraram que apenas após 90 minutos de exercício de baixa intensidade em ambiente poluído é possível observar alterações em marcadores das vias de inflamação. Contudo, apesar desse achado poder significar que as vias inflamatórias são ativadas apenas após uma determinada quantidade de poluentes ser inalada, é preciso ter cautela nessa interpretação, uma vez que é característica dessas citocinas apresentar uma resposta lenta, observada apenas após decorrido um tempo do estímulo inicial.

Por sua vez, o aumento na concentração de VEGF pode ser explicado devido a essa molécula ser sinalizadora de angiogênese, podendo sua liberação ser estimulada por diferentes fatores de estresse ao endotélio vascular (RAMAKRISHNAN et al., 2014). Como foi observado aumento tanto a pressão arterial sistólica quanto diastólica, é possível sugerir também um aumento da pressão vascular alveolar (SAKAO et al., 2015), o que diminui as trocas gasosas entre alvéolo e capilar, constituindo um mecanismo parcial de hipóxia. Por sua vez, a hipóxia por si só é um estímulo para a produção e liberação de VEGF (RAMAKRISHNAN et al., 2014). Além disso, a presença de poluentes depositados no alvéolo pode também estar colaborando para a resposta inflamatória, o que pode estar causando lesão tecidual local em tecidos do pulmão e de sua rede vascular. Portanto, essa agressão tecidual ao endotélio vascular pulmonar pode estar sendo um segundo estímulo para o aumento no VEGF. Dessa forma, essa resposta pode ser interpretada como uma reação do organismo ao estresse vascular imposto pela presença de poluentes, na tentativa de reestabelecer a função normal do sistema. Contudo, é importante frisar que esse aumento no VEGF pode nem sempre ser benéfico, uma vez que essa citocina pode ser utilizada por tumores cancerígenos para aumentar seu aporte sanguíneo e aumentar sua velocidade de crescimento (LATHAM et al., 2010).

Com os comportamentos observados para as citocinas, é possível sugerir que, após 90 minutos de exercício aeróbico contínuo de intensidade moderada, a presença de poluentes no ar inalado é capaz de induzir um quadro de inflamação, tanto através da estimulação de vias pró-inflamatórias quanto através da inibição de vias anti-inflamatórias.

5.4.6 Metaboloma

A análise do metaboloma apontou diferenças e semelhanças nos grupos de metabólitos que distinguiram os ambientes limpo e poluído em cada momento analisado. Primeiramente, como é feito em grande parte dos estudos que utilizam a metabolômica como ferramenta de

investigação, é interessante analisar o comportamento dos metabólitos em relação às vias energéticas, ou seja, como o ambiente poluído pode estar afetando a bioenergética durante o exercício físico. Depois, foi feita uma associação dos metabólitos com alterações em vias já sabidamente afetadas pela poluição atmosférica, como estresse oxidativo e inflamação, esta última também demonstrada na presente tese. Em toda a discussão sobre as alterações no metaboloma, optamos por destacar as alterações que foram observadas no ambiente poluído em relação ao ambiente limpo.

5.4.7 Metaboloma e bioenergética

Analisando-se o comportamento dos metabólitos aos 30 minutos de exercício, é possível observar alterações no ambiente poluído capazes de sugerir mudanças no funcionamento das vias energéticas. Um dos traços observados foi o metabolismo incompleto de lipídios. Tal fato pode ser apontado pelo aumento na concentração sanguínea de acetona, produto final do metabolismo de corpos cetônicos, e pela diminuição da concentração do 3-hidroxi-3-metilglutarato. Esse metabolismo direcionado para a cetogênese aponta, em primeiro lugar, para uma formação de acetil-CoA em uma taxa mais elevada do que a sua capacidade de ser utilizada no próximo passo da via energética, que é o ciclo de Krebs. De fato, foi observada também uma diminuição no succinato, um dos intermediários do ciclo, assim como do metilsuccinato, um de seus precursores, e do 2-metilglutarato, formado a partir do succinato. Além disso, houve também diminuições nas concentrações sanguíneas de aminoácidos precursores de outros intermediários do ciclo de Krebs, como a isoleucina e a metionina, e outros compostos envolvidos em vias capazes de alterar o conteúdo disponível desses e outros aminoácidos, como a ornitina e o 2-hidroxibutirato. Por outro lado, houve aumento da treonina, um aminoácido essencial capaz de favorecer a síntese de outros aminoácidos precursores de intermediários das vias energéticas. Posteriormente, analisando-se ainda o último passo da via oxidativa, a cadeia de transporte de elétrons (CTE), foi observado um aumento na concentração sanguínea de malonato. Sabendo-se que o malonato possui uma função inibitória sobre o complexo II da CTE (Wojtovich et al. 2013), é possível sugerir que o aumento desse metabólito é capaz de diminuir a taxa de formação de ATP através dessa via, podendo alterar também os processos anteriores.

Aos 60 minutos de exercício, também é possível sugerir a ocorrência do metabolismo incompleto de lipídios. Porém, nesse momento, não foi observada diferença na concentração de acetona entre os ambientes, mas sim do acetoacetato. O acetoacetato é o precursor da acetona na última reação do metabolismo de corpos cetônicos. Seu aumento pode significar

uma diminuição na capacidade de realizar essa última reação de conversão. Apesar do acetoacetato ser utilizado como fonte de energia em tecidos extra-hepáticos, por possuir característica levemente ácida, seu acúmulo pode contribuir para diminuição do pH sanguíneo (NELSON; COX, 2014). Além disso, a formação de corpos cetônicos diminui a demanda celular por glicose, o que pode ser um dos fatores ligados à associação entre poluição atmosférica e diabetes (PARK et al., 2015). Também similar ao observado aos 30 minutos, houve diminuição em precursores de intermediários do ciclo de Krebs, como o metilsuccinato e isoleucina, assim como da ornitina e do 2-hidroxiubutirato, capazes de influenciar a biodisponibilidade de aminoácidos tanto para vias energéticas quanto para a síntese proteica. Foi observada uma diminuição da concentração sanguínea de creatina, a qual pode estar sendo captada pelos músculos exercitados, o que pode indicar uma necessidade do metabolismo anaeróbico no fornecimento de energia. Por fim, houve aumento do malonato, sugerindo, assim como em 30 minutos, uma possível diminuição no fluxo de elétrons na CTE.

Ao final dos 90 minutos de exercício, assim como aos 30 minutos, foi observada uma diminuição da metionina, e similarmente aos 30 e 60 minutos, uma diminuição do 2-hidroxiubutirato, ambos envolvidos na disponibilidade de aminoácidos tanto para as reações de bioenergética quanto para as reações de síntese proteica. Também similar aos momentos 30 e 60 minutos, o metilsuccinato sanguíneo estava diminuído aos 90 minutos de exercício em ambiente poluído, sugerindo menor aporte para a formação de succinato, um intermediário do ciclo de Krebs. Diferentemente dos 30 minutos, aos 90 minutos houve diminuição da treonina sanguínea no ambiente poluído. Além de sugerir que isso pode diminuir a disponibilidade de aminoácidos, tanto a própria treonina quanto outros formados a partir dela, indica que esse aminoácido pode ter uma resposta tempo-dependente à presença de poluentes no ar inalado. Em paralelo com o observado aos 60 minutos, com 90 minutos houve diminuição da creatina sanguínea, possivelmente indicando uma maior necessidade do metabolismo anaeróbico no fornecimento de energia no ambiente poluído comparado ao ambiente limpo. Interessantemente, aos 90 minutos no ambiente poluído foi observada uma diminuição no 5-aminolevulinato, um componente intermediário da síntese do heme, composto essencial para a estrutura dos eritrócitos e, conseqüentemente, para o transporte e fornecimento de oxigênio para as fibras musculares em exercício.

Interessantemente, houve aumento da carnitina sanguínea aos 90 minutos de exercício no ambiente poluído. A carnitina é essencial para o transporte de ácidos graxos através da membrana externa da mitocôndria, participando ativamente da facilitação do processo de β -oxidação. Sabidamente, um aumento na oxidação de ácidos graxos maior do que a demanda

energética celular pode gerar espécies reativas, capazes de iniciar um processo de estresse oxidativo (NELSON; COX, 2014). Dessa forma, esse aumento na carnitina pode sugerir um desacoplamento da velocidade da β -oxidação com a necessidade energética da célula, o que pode ser prejudicial.

Em resumo, em relação à bioenergética, foi possível observar diferenças interessantes no metaboloma entre o ambiente limpo e poluído. No geral, o metabolismo de lipídios parece ter sido alterado em todos os momentos analisados, com sugestões de uma maior taxa da β -oxidação no ambiente poluído. Apesar de a maior degradação de lipídios parecer uma alteração positiva em termos bioenergéticos, principalmente para atividades de longa duração, os resultados relativos a intermediários do ciclo de Krebs e aminoácidos precursores de intermediários sugerem uma menor disponibilidade de substratos para a ocorrência total do ciclo. Além disso, é possível também que tenha havido uma inibição de um dos passos da CTE. Em outras palavras, a maior degradação de ácidos graxos não parece estar levando a uma maior conversão de energia proveniente dos lipídios no ambiente poluído. Consequentemente, isso pode direcionar mais rapidamente as vias metabólicas para a formação de corpos cetônicos, o que em conjunto facilita também a ocorrência de processos de estresse oxidativo (NELSON; COX, 2014), o qual já foi anteriormente relacionado aos efeitos da poluição (CUTRUFELLO et al., 2012; GILES; KOEHLE, 2014).

5.4.8 Metaboloma, inflamação, estresse oxidativo e outras alterações biológicas

Além dos processos bioenergéticos, é possível também inferir sobre alterações em outras vias importantes e já conhecidamente afetadas pela presença de poluentes atmosféricos nos diferentes momentos analisados. Inicialmente, aos 30 minutos de exercício em ambiente poluído, foi observada uma diminuição em conjunto da metionina, 2-hidroxi butirato e metilsuccinato, todos envolvidos no metabolismo da cisteína. Um dos produtos formados nessa via metabólica é a glutatona. A glutatona tem um papel importante na regulação de uma vasta gama de processos, como ações antioxidantes, eritropoiese, leucopoiese e, consequentemente, na função do sistema imune e em processos inflamatórios (LIU et al., 2014). Assim, uma menor síntese de glutatona pode indicar uma menor capacidade do organismo de regular processos inflamatórios e de estresse oxidativo, já mostrados como efeitos da poluição atmosférica (CUTRUFELLO et al., 2012; GILES; KOEHLE, 2014).

Outra observação interessante foi a alteração de metabólitos relacionados ao sistema imunológico. Por exemplo, a diminuição na concentração sanguínea de fosfocolina no ambiente poluído poderia ser interpretada como positiva, devido à ligação desse metabólito

com a resposta inflamatória (FROSTEGARD, 2013). Contudo, esse fosfolipídio parece ser importante na ativação inicial da resposta imune, necessária para o combate de infecções, como na pneumonia (HERGOTT et al., 2015). Assim, essa diminuição na fosfocolina pode caracterizar um impedimento da resposta aos poluentes inalados. Além disso, a fosfocolina é um importante componente da membrana de células endoteliais e da substância surfactante alveolar. Portanto, a diminuição na fosfocolina no ambiente poluído pode indicar uma diminuição da proteção tanto nas vias aéreas de condução quanto na região dos alvéolos (BARITUSSIO, 2004).

Paralelamente, foi observado um aumento no 4-piridoxato, o produto catabólico da vitamina B6. A menor disponibilidade de vitamina B6 no organismo já foi associada um quadro sistêmico de inflamação (UELAND et al., 2016) e a doenças cardiovasculares (SPINNEKER et al., 2007). Dessa forma, o aumento no 4-piridoxato no ambiente poluído pode sugerir um menor tempo de meia-vida da vitamina B6 com a inalação de poluentes, o que pode favorecer as consequências negativas da diminuição dessa vitamina no organismo. Também aos 30 minutos em ambiente poluído, houve aumento da glutamina e da treonina. O aumento desses aminoácidos pode estar relacionado ao aumento da atividade imune, uma vez que são importantes ativadores do sistema imune (LI et al., 2007; SIKALIDIS, 2015). Dessa forma, essa pode ser uma tentativa inicial de resposta ao estresse imposto pela presença de poluentes no ar inspirado e, conseqüentemente, nos alvéolos e na corrente sanguínea.

Aos 60 minutos de exercício, similar ao observado em 30 minutos, houve diminuição na concentração sanguínea de 2-hidroxibutirato e metilsuccinato no ambiente poluído. Como já mencionado, esses metabólitos participam do metabolismo da cisteína e sua diminuição indica também uma menor formação de glutatona. Assim, esse achado sugere que, também aos 60 minutos, a inalação de poluentes pode afetar vias capazes de regular processos inflamatórios e antioxidantes (LIU et al., 2014). Como já mencionado, houve aumento do acetoacetato em 60 minutos. Além de sua participação em vias energéticas, o acetoacetato é também um importante substrato para a síntese de lipídios que irão compor a substância surfactante nos alvéolos pulmonares (SHEEHAN; YEH, 1985). Estudos prévios demonstraram que poluentes atmosféricos, principalmente materiais particulados, podem se depositar nos alvéolos pulmonares, causando uma resposta inflamatória local (CUTRUFELLO et al., 2012). É possível que a resposta inflamatória que causa lesão tecidual nos alvéolos esteja desencadeando um mecanismo de resposta através da síntese de surfactante, na tentativa de manter a integridade alveolar e as trocas gasosas em níveis

normais. Tal achado se associa de forma muito interessante com o aumento do VEGF observado posteriormente, aos 90 minutos de exercício.

Também diminuído no ambiente poluído, o guanidoacetato é um metabólito envolvido na síntese de creatina a partir de arginina, sendo essa uma importante via de fornecimento de energia para as células do sistema nervoso central (NELSON; COX, 2014). Além disso, a própria creatina estava também diminuída aos 60 minutos de exercício no ambiente poluído. Além de seu papel no metabolismo energético, a creatina tem mostrado diferentes funções importantes para a saúde, como funcionamento do sistema nervoso central e regulação do sistema imune (RIESBERG et al. 2016). Além disso, Qasim e Mahmood (2015) observaram um efeito antioxidante da creatina sanguínea em eritrócitos e linfócitos, o que reforça seu papel no funcionamento do sistema imune. Adicionalmente, recentemente foi demonstrado que a creatina pode até mesmo exercer um papel no controle do aumento de tumores cancerígenos (CAMPOS-FERRAZ et al., 2016). Essas funções da creatina podem ser relacionadas a diferentes efeitos deletérios da poluição atmosférica sobre o sistema nervoso (BOS et al., 2014), função imunológica e estresse oxidativo (BRUCKER et al., 2013).

Dois achados relacionados aos 60 minutos de exercício são particularmente interessantes por se tratarem de metabólitos envolvidos em processos regulatórios abrangentes. Em primeiro lugar, no ambiente poluído, houve diminuição na concentração sanguínea de 3-hidroxiisovalerato. Esse metabólito, também conhecido como HMB, é um precursor do PGC-1 α , um importante fator de regulação da biogênese mitocondrial e de uma série de atividades envolvendo o DNA nuclear, como a síntese e degradação de proteínas (SZCZEŚNIAK et al., 2015; HE et al., 2016). Dessa forma, a diminuição desse metabólito em decorrência da poluição pode sugerir que em ambientes poluídos há também uma menor síntese de PGC-1 α , prejudicando assim uma série de processos regulatórios celulares. De forma similar, houve também uma diminuição na concentração sanguínea de melatonina no ambiente poluído. A melatonina é um hormônio produzido e liberado pela glândula pineal, localizada próxima à região central do encéfalo, porém não protegida pela barreira hematoencefálica. A melatonina é um importante regulador de processos fisiológicos relacionados ao ciclo sono-vigília (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2001). Além disso, possui também papel regulatório em importantes processos conhecidamente afetados pela poluição atmosférica, como inflamação, estresse oxidativo, ativação do sistema imune e regulação da expressão do GLUT4, importante na captação da glicose sanguínea (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2011; CIPOLLA-NETO et al., 2014). Interessantemente, Romero et al. (2014) demonstraram que a melatonina possui um efeito protetor contra a intoxicação por

metais, o que é particularmente interessante para os achados da presente tese. Com esses dois achados, é possível apontar um efeito negativo da inalação de poluentes durante o exercício em vias regulatórias importantes para uma vasta gama de processos fisiológicos e do funcionamento celular.

Também no ambiente poluído, foram observados maiores aumentos na concentração de N-acetilglicosamina e trimetilamina. A N-acetilglicosamina é um açúcar que pode ser inserido em proteínas em um mecanismo pós-traducional de regulação de função, por exemplo, enzimática e de receptores (SLAWSON et al., 2006). Além disso, é também um componente do ácido hialurônico, presente em cartilagens, pele e na parede arterial (SLAWSON et al., 2006). Tal achado se associa de forma interessante com estudos prévios que mostraram que a exposição à poluição atmosférica pode ser capaz de aumentar a pressão arterial devido a um aumento no stiffness arterial (UNOSSON et al., 2013). Paralelamente, níveis elevados de trimetilamina já foram associados a diferentes patologias, como diabetes e doenças cardiovasculares, como revisado por Chhibber-Goel et al. (2016), as quais também já foram associadas à poluição do ar (MARINO et al., 2015). Em conjunto, esses achados e suas associações com resultados de estudos anteriores podem ser capazes de sugerir através de quais vias a exposição atmosférica pode causar efeitos deletérios à saúde.

Similar ao observado em 30 minutos, houve aumento na concentração de glutamina com 60 minutos de exercício em ambiente poluído, sugerindo um aumento da atividade imunológica (LI et al., 2007; SIKALIDIS, 2015). Associado a isso, houve também um aumento na concentração sanguínea de 1,7-dimetilxantina. Esse metabólito já demonstrou exercer um papel inibidor da inflamação pulmonar e sistêmica (GERAETS et al., 2010). Dessa forma, os aumentos na glutamina e na 1,7-dimetilxantina podem caracterizar uma resposta continuada à presença de poluentes.

Em 90 minutos de exercício, foram observadas similaridades com os momentos anteriores. Uma via que se mostrou possivelmente alterada em todos os momentos analisados foi o metabolismo da cisteína. Em 90 minutos, também foram observadas diminuições nas concentrações sanguíneas de metionina, 2-hidroxiubutirato e metilsuccinato. Como já mencionado, essa via é responsável pela formação de glutathiona, um composto com importante função regulatória de processos importantes e relacionados a malefícios provocados pela exposição à poluição atmosférica, como estresse oxidativo, síntese de hemácias e leucócitos, sistema imune e inflamação (LIU et al., 2014).

Também similar aos 60 minutos de exercício, houve diminuição da creatina aos 90 minutos no ambiente poluído. A creatina é formada a partir dos aminoácidos arginina, glicina

e metionina, estando essa última também diminuída aos 90 minutos. Portanto, a diminuição da creatina pode ser mais uma consequência da diminuição da metionina. Desse modo, assim como mencionado para os 60 minutos, a diminuição da creatina pode indicar alterações importantes, uma vez que esse metabólito tem sido associado a funções importantes de regulação do estresse oxidativo (QASIM; MAHMOOD, 2015), do sistema imune e do sistema nervoso central (RIESBERG et al., 2016). Com esse achado, parece que a presença de poluentes pode ser capaz de influenciar vias que controlam a síntese ou degradação de creatina, diminuindo seus níveis sanguíneos e, consequentemente, sua capacidade de atuar na modulação do sistema imune, de prevenir o estresse oxidativo e até mesmo de ser utilizada pelo sistema nervoso central.

A trimetilamina mostrou um aumento aos 90 minutos de exercício no ambiente poluído, semelhante à observação em 60 minutos. Como descrito acima, diferentes patologias cardiovasculares e o diabetes já foram associados a níveis aumentados desse metabólito (CHHIBBER-GOEL et al., 2016). Assim, essa pode ser uma importante alteração no metaboloma associada ao aumento da inalação de poluentes. Pela primeira vez aos 90 minutos, a acetilcolina mostrou um aumento no ambiente poluído. Ela atua como neurotransmissor do sistema nervoso parassimpático, podendo estar relacionada a diferentes ações, dependendo do receptor presente na membrana da célula-alvo. Interessantemente, a acetilcolina participa da resposta do corpo carotídeo a alterações nas pressões parciais de O_2 e CO_2 e diminuição do pH sanguíneo. Com a diminuição do pH do sangue, o corpo carotídeo envia um estímulo aferente ao hipotálamo, o qual ativa o centro de respiração e inicia um aumento da ventilação. Dessa forma, apesar de um maior aumento na ventilação no ambiente poluído não ter sido observado no presente estudo, é possível que esse aumento passasse a ser pronunciado em momentos posteriores.

Por outro lado, foram observadas diminuições nas concentrações sanguíneas de 1,3-dimetilurato e aminolevulinato no ambiente poluído após os 90 minutos de exercício. O 1,3-dimetilurato é um composto metilado análogo ao ácido úrico, ou seja, possuem fórmula molecular semelhante. Como encontrado por Nishida (1991), esses compostos são capazes de inibir a peroxidação lipídica através da diminuição da formação de substâncias reativas derivadas do ácido tiobarbitúrico. Dessa forma, esses compostos são eficazes em diminuir os efeitos do estresse oxidativo. Por sua vez, o aminolevulinato é um intermediário na síntese do heme, importante componente da hemoglobina envolvido no transporte de ferro e O_2 . Além disso, Higashikawa et al. (2013) mostraram que o aminolevulinato pode ser uma ferramenta interessante para controle do diabetes, pois a administração oral de aminolevulinato mostrou

diminuir os níveis de glicemia de jejum e pós-prandial em indivíduos hiperglicêmicos. Coletivamente, a diminuição desses dois metabólitos sugere que a inalação de poluentes atmosféricos, assim como sua possível presença no sistema cardiovascular e em outros órgãos, pode ser capaz de afetar vias bastante importantes na manutenção da homeostasia do organismo e de funções vitais para a saúde, como o controle da glicemia.

Curiosamente, ao contrário do que ocorreu aos 30 minutos de exercício, houve diminuição da concentração sanguínea de treonina, um aminoácido com papel estimulante do sistema imune (LI et al., 2007). Analisando-se dessa forma, é possível sugerir que a treonina possui um comportamento diferente ao longo do tempo em resposta à exposição à poluição do ar e sua diminuição pode significar que a presença de poluentes é capaz de suprimir essa via imuno-excitatória, diminuindo a capacidade do organismo de responder a agentes patogênicos e aos próprios poluentes atmosféricos via treonina. Esse achado pode sugerir que as respostas imunes associadas à inflamação podem ser moduladas por vias específicas em diferentes intervalos de tempo.

Por outro lado, em paralelo com 30 e 60 minutos, foi observado aumento da glutamina também após os 90 minutos de exercício, sugerindo que a estimulação do sistema imune no ambiente poluído através da glutamina (LI et al., 2007) foi uma via atuante durante toda a exposição aos poluentes durante o exercício. Adicionalmente, também houve aumento da histidina no ambiente poluído. A histidina é o precursor da histamina, essa associada à resposta imune e inflamatória (HASEGAWA et al., 2011). Por sua vez, a histidina mostrou ter um efeito anti-inflamatório (PETERSON et al., 1998). Além disso, Gerber (1975) observaram uma menor concentração de histidina sanguínea em pacientes com artrite reumatóide, sugerindo uma maior captação de histidina pelos tecidos em processo de inflamação decorrente da artrite. Interessantemente, em um estudo analisando pacientes com asma (JUNG et al., 2013) e utilizando a mesma técnica de metabolômica empregada na presente tese, também foram observados aumentos nas concentrações sanguíneas de glutamina e histidina, sugerindo esses metabólitos como importantes nas vias de resposta do organismo ao estresse nas vias aéreas. Estudos prévios demonstraram que portadores de asma são particularmente sensíveis aos efeitos da poluição atmosférica (PEARCE et al., 2015). Dessa forma, é possível apontar esses dois metabólitos como importantes marcadores de diferentes tipos de estresse no sistema respiratório.

Por fim, pela primeira vez após os 90 minutos de exercício no ambiente poluído, houve aumento da carnitina sanguínea. A carnitina é essencial para o metabolismo de ácidos graxos, uma vez que atua no transporte desses ácidos através da membrana externa da

mitocôndria para as reações da β -oxidação (NELSON; COX, 2014). Porém, além disso, a carnitina parece exercer também importantes papéis no controle da glicemia e lipídemia (VIDAL-CASARIEGO et al., 2013) e no funcionamento do miocárdio (DINICOLANTONIO et al., 2014). Assim, o aumento da carnitina sanguínea após esse tempo mais longo de exercício em combinação com a exposição à poluição atmosférica pode caracterizar uma resposta protetora do organismo, no sentido de prevenir efeitos deletérios graves ao tecido cardíaco e melhorar a regulação do conteúdo de glicose e lipídios sanguíneos, uma vez que a poluição atmosférica já mostrou afetar esses processos (MEO et al., 2015).

Em resumo, a exposição à poluição atmosférica durante o exercício pareceu alterar o metaboloma em importantes vias regulatórias que podem ser associadas a achados de estudos prévios que observaram influência da poluição sobre o sistema imune, sistema cardiorrespiratório, doenças metabólicas, assim como inflamação e estresse oxidativo. Em linhas gerais, a exposição aos poluentes parece ter afetado fortemente a via de síntese da glutatona, um importante agente regulador. Além disso, em paralelo com os achados da bioenergética, houve um maior direcionamento para a cetogênese, o que pode também estar associado a mudanças que, em conjunto, sugerem uma maior facilidade para estabelecimento do estresse oxidativo. Adicionalmente, alterações em diferentes metabólitos sugerem também uma alteração nas vias de ativação do sistema imune, o que pode estar associado a quadros de inflamação comumente associados à poluição atmosférica.

De maneira interessante, a alteração em alguns metabólitos sugere que o organismo pode estar atuando através de diferentes vias em resposta ao estresse imposto pelos poluentes. Dentre essas vias, o aumento da glutamina apareceu pronunciado nos três momentos analisados, indicando esse aminoácido como um possível marcador da resposta do organismo à presença de poluentes no ar inalado. Além desse, outros metabólitos também sugerem mecanismos de proteção, como aumento de inibidores de inflamação e de protetores do tecido cardíaco.

5.5 Conclusão

Os dados do presente apontaram para a reversão do efeito hipotensor pós-exercício quando esse é realizado em ambiente poluído. Esse aumento na pressão arterial decorrente do ambiente poluído em indivíduos normotensos é um fator preocupante, uma vez que a hipertensão arterial é um dos principais riscos de mortalidade no mundo e o exercício tem sido utilizado como ferramenta em seu combate. Com isso, é possível suspeitar que o

benefício da prática de atividades físicas no controle da pressão arterial pode ser restrito a ambientes com baixos níveis de poluição atmosférica, o que prejudica a busca por qualidade de vida principalmente de habitantes de grandes cidades.

Além disso, foi observado também um aumento de marcadores inflamatórios após 90 minutos de exercício no ambiente poluído. A inflamação está fortemente associada às doenças crônico-degenerativas que vêm aumentando sua incidência nos últimos anos. Similarmente ao discutido acima, o exercício também é capaz de promover efeitos anti-inflamatórios, podendo ser utilizado como parte da prevenção e tratamento para algumas dessas doenças. Contudo, esse efeito benéfico do exercício pode também estar sendo condicionado à qualidade do ar inalado durante a prática.

Em relação ao metaboloma, nossos dados exploratórios forneceram pontos interessantes em relação a vias metabólicas associadas às respostas biológicas à poluição atmosférica. Interessantemente, algumas distinções nas respostas das vias foram observadas entre os diferentes momentos de análise. Dessa forma, nossos dados podem ser úteis para pesquisas futuras no sentido de direcionar as buscas para um maior esclarecimento dos sistemas afetados pela poluição atmosférica. Além disso, é possível sugerir que os efeitos da poluição atmosférica sobre as vias metabólicas durante o exercício são dependentes da duração, auxiliando para que, no futuro, a qualidade do ar seja levada em conta para o planejamento do transporte ativo diário de pessoas e até mesmo de sessões de treinamento.

Com isso, nossos resultados reforçam os achados anteriores sobre os efeitos deletérios da poluição atmosférica para a saúde de praticantes de atividades físicas. Em adição a dados prévios, foi possível observar diferentes vias afetadas pela poluição, que podem colaborar com o entendimento dos efeitos da presença de poluentes no organismo, assim como possíveis métodos para combatê-los. Além disso, coletivamente, pode-se sugerir que exercícios de maiores durações podem aumentar mais os efeitos da poluição atmosférica, possivelmente devido à maior inalação de poluentes, o que foi apontado pelo aumento da inflamação apenas após os 90 minutos, assim como pelas diferenças nas vias alteradas em relação ao tempo.

6 Estudo 2: Análise da influência da intensidade do exercício realizado em ambiente com poluição atmosférica sobre o sistema cardiovascular, inflamação e metabóloma

6.1 Introdução

A prática de exercícios físicos tem demonstrado resultar em inúmeros benefícios à saúde, tais como melhoras em variáveis cardiorrespiratórias (GREEN, 2009; PADILLA et al., 2011) e anti-inflamatórias (SZOSTAK; LAURANT, 2011). Isso tem levado alguns pesquisadores a sugerir que a sua prática regular é importante para a manutenção da saúde (PAFFENBARGER et al., 1986; KOKKINOS; MYERS, 2010). Grande parte das modalidades mais acessíveis e realizadas por indivíduos que buscam hábitos saudáveis, como caminhada, corrida e ciclismo, são realizadas em ambientes abertos. Todavia, cerca de 52% das pessoas no planeta vivem em grandes cidades (UNITED NATIONS, 2012), dentre as quais a maior parte possui elevados níveis de poluição atmosférica. Dessa forma, a prática de exercícios físicos em ambientes abertos pode aumentar a exposição à poluição, principalmente nos grandes centros urbanos.

Está bem estabelecido na literatura que o tráfego de veículos e a atividade industrial são as principais fontes de poluentes atmosféricos em diversas cidades de grande porte (CHEN; KAN, 2008), caracterizando os produtos da queima de combustíveis fósseis como os componentes da poluição atmosférica mais analisados em relação à saúde (GILES; KOEHLE, 2014). Yatera et al. (2008) observaram que a exposição ao material particulado (PM), composto por partículas sólidas e líquidas suspensas no ar, aumentou o número de monócitos em placas de aterosclerose, indicando aumento do estado inflamatório. Além disso, Alonso et al. (2003) demonstraram que a exposição ao monóxido de carbono (CO) reduziu significativamente a atividade da enzima citocromo C oxidase. Adicionalmente, quando se considera o exercício realizado em ambientes abertos, devido à exposição à luz solar, é necessário considerar também o ozônio como um possível poluente atuante em vias biológicas (ARIS et al., 1993; GILES; KOEHLE, 2014), como no aumento da resposta inflamatória local no sistema respiratório de indivíduos saudáveis (FRY et al., 2014).

Estudos prévios indicam que a exposição à poluição atmosférica é capaz de desencadear processos prejudiciais à saúde de forma sistêmica, não estando restritos ao sistema respiratório, sendo comum o aumento do estado inflamatório com maiores níveis de poluição atmosférica (LIM et al., 2012). Curiosamente, Nyhan et al. (2014) mostraram que entre os indivíduos expostos à poluição, aqueles ativos (ciclistas e pedestres) estavam mais

propensos a uma maior inalação e deposição alveolar de PM comparados aos inativos (passageiros de trem e ônibus). Logo, é possível que, em ambientes poluídos, a atividade física pode tanto ter alguns de seus efeitos benéficos suprimidos quanto aumentar o risco da exposição à poluição atmosférica. De fato, alterações biológicas importantes têm sido mostradas com a realização de exercícios em ambiente poluído (GILES; KOEHLE, 2014). Pekkanen et al. (2012) observaram uma associação positiva entre a concentração prévia de $PM_{2,5}$ e o risco de depressão do segmento ST durante um exercício submáximo em cicloergômetro, indicando uma maior chance de isquemia cardíaca. Além disso, Kargarfard et al. (2015) observaram que durante um exercício máximo em ambiente poluído houve diminuições significativas no VO_{2max} (~ 3,9%) e contagem total de células sanguíneas vermelhas (~ 6,4%) quando comparado ao ambiente não-poluído em 19 indivíduos saudáveis. Mais recentemente, Giles et al. (2014), observaram que 30 minutos de exercício em ambiente poluído resultava em aumentos significativos no VO_2 , VE e VCO_2 em intensidade baixa, mas não em intensidade alta (30% e 60% da potência do VO_{2pico} , respectivamente).

Embora esses estudos apresentem informações relevantes acerca do efeito do exercício praticado em ambiente poluído, é importante destacar que a intensidade do exercício é capaz de gerar aumentos no VO_2 e na VE através de outros mecanismos (FUKUOKA et al., 2002; ZOUHAL et al., 2008), o que pode estar mascarando os efeitos do ambiente poluído no estudo de Giles et al. (2014). Não obstante, é provável que a mensuração das trocas gasosas durante o exercício não seja o melhor método para se determinar os efeitos adversos da poluição em exercícios de diferentes intensidades. Grande parte dos estudos tem mostrado alterações imunes (JACOBS et al., 2010; FLOURIS et al., 2012) e inflamatórias (ARIS et al., 1993; BLOCK; CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, 2009), as quais apresentam picos de alteração em diferentes momentos e podem gerar efeitos adversos em distintos sistemas do organismo. Dessa forma, torna-se importante investigar o efeito da intensidade do exercício em ambiente poluído através medidas capazes de proporcionar informações acerca da resposta sistêmica dos sistemas fisiológicos durante o esforço físico.

A análise do metaboloma parece ser uma ferramenta capaz de proporcionar uma resposta fisiológica global (ENEA et al., 2009), uma vez que já foram identificados aproximadamente 4000 metabólitos no soro humano (PSYCHOGIOS et al., 2011), possibilitando a geração de hipóteses distintas das já demonstradas, bem como a descoberta de novos biomarcadores (EMWAS et al., 2013). Essa análise parece bastante atrente para pesquisas envolvendo exercício físico, uma vez que essa é uma prática que provoca alterações nos diversos sistemas do organismo, necessitando de uma análise abrangente para sua leitura

mais completa, o que já tem sido realizado em alguns estudos (NIEMAN et al., 2014; NIEMAN et al., 2015). Adicionalmente, a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) parece também uma técnica não invasiva, de fácil aplicação e baixo custo capaz de representar o estresse imposto ao sistema cardiovascular (MCCRATY; SHAFFER, 2015). Contudo, até o presente momento, foram realizadas análises apenas de um pequeno número de marcadores em conjunto, o que não permite estabelecer uma resposta sistêmica ao exercício em ambiente poluído. Além disso, o efeito da intensidade do exercício foi visto apenas em variáveis ventilatórias. Portanto, o objetivo do presente estudo será analisar a resposta do perfil metabólico e da VFC ao exercício com diferentes intensidades em ambiente poluído. A nossa hipótese é que o exercício em ambiente poluído irá induzir a um perfil metabólico distinto e um maior estresse cardiovascular comparado ao limpo. Também se espera que esses efeitos sejam aumentados com o exercício de maior intensidade, principalmente devido a uma maior ventilação e inalação de poluentes, comparado ao de menor intensidade.

6.2 Metodologia específica

6.2.1 Desenho experimental

A figura 1 traz uma representação esquemática do desenho experimental (painel A) assim como de uma única sessão (painel B). Ao todo, foram realizadas 5 sessões, sendo: 1) medidas antropométricas e teste progressivo até a exaustão voluntária para caracterização da amostra e determinação da intensidade dos testes de cargas constantes; 2 e 3) dois testes de carga constante em intensidade moderada em ambiente limpo e poluído; 4 e 5) dois testes de carga constante em intensidade alta em ambiente limpo e poluído. As sessões 2-3 e 4-5 serão contrabalançadas entre si. Os participantes foram instruídos a não realizarem exercícios vigorosos nas 24 horas precedentes às sessões experimentais. Foi dado um intervalo mínimo de 48 horas entre as sessões.

Figura 1. Representação esquemática do desenho experimental (painel A) e de uma única sessão (painel B). Os quadros em cinza representam as sessões experimentais realizadas em ambiente poluído. TPE: teste progressivo até a exaustão voluntária. No painel A, as sessões de 2 a 5 foram randomizadas. No painel B, as setas indicam os momentos de coleta de sangue, da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da percepção subjetiva de esforço (PSE).

6.2.2 Testes de cargas constantes em intensidade baixa

Os testes tiveram duração de 30 minutos e a intensidade escolhida para esses testes foi igual a 25% da diferença entre o LV e o PCR. Em ambos os testes, foi realizado um aquecimento sem carga com duração de 5 minutos a 60 rpm. Após o aquecimento, a intensidade foi ajustada para o teste. Coletas sanguíneas e da percepção subjetiva de esforço foram obtidas nos momentos pré e logo após os 30 minutos de exercício. A VFC foi analisada em janelas de 10 minutos antes do início do exercício, nos últimos 10 minutos de exercício e após o término do teste. A PA foi mensurada nos momentos pré e logo após o término dos testes.

6.2.3 Testes de cargas constantes em intensidade alta

Os testes tiveram duração de 30 minutos e a intensidade escolhida para esses testes foi igual a 75% da diferença entre o LV e o PCR. Essa intensidade foi determinada em um estudo piloto realizado previamente, sendo a maior intensidade que poderia ser mantida durante 30 minutos de exercício. Em ambos os testes, foi realizado um aquecimento sem carga com duração de 5 minutos a 60 rpm. Após o aquecimento, a intensidade foi ajustada para o teste. Coletas sanguíneas e da percepção subjetiva de esforço foram obtidas nos momentos pré e

logo após os 30 minutos de exercício. A VFC foi analisada em janelas de 10 minutos antes do início do exercício, nos últimos 10 minutos de exercício e após o término do teste. A PA foi mensurada nos momentos pré e logo após o término dos testes.

6.2.4 Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk. A comparação da concentração média de $PM_{2,5}$, PM_{TOTAL} , NO e NO_2 , assim como dos valores de temperatura e umidade relativa do ar foi realizada através de uma ANOVA de dois caminhos com post hoc de Tuckey. A FC média e a VE média das sessões 2, 3, 4 e 5 foram comparadas através de uma ANOVA de medidas repetidas de dois caminhos (ambiente x intensidade). Os valores de PSE mensurados logo após o término do exercício foram comparados através de uma ANOVA de medidas repetidas de dois caminhos (ambiente x intensidade). Os valores de PA sistólica e diastólica foram expressos como deltas (pós – pré) e comparados através de uma ANOVA de medidas repetidas de dois caminhos (ambiente x intensidade). Os parâmetros da VFC foram comparados através de uma ANOVA de medidas repetidas de três caminhos (ambiente x intensidade x momento). Devido à natural grande diferença nas concentrações das citocinas sanguíneas avaliadas, para fins de facilitação da comparação, as concentrações das obtidas foram expressas como fold changes (pós/pré). Essa transformação permite uma melhor comparação do comportamento das citocinas no tempo, nos diferentes ambientes e entre as demais. Os valores de fold-change foram comparados através de uma ANOVA de medidas repetidas de dois caminhos (ambiente x intensidade). Para as ANOVAS realizadas, foi utilizada a correção de *Bonferroni*. Todas as análises foram conduzidas com a utilização do software estatístico SPSS (versão 17.0, SPSS INC., Chicago, IL, USA), e o nível de significância adotado para todas as análises foi $\alpha = 0.05$.

Para os metabólitos sanguíneos, inicialmente foi utilizada uma análise de componentes principais (PCA). Este tipo de análise proporciona uma rápida visualização das semelhanças ou diferenças no conjunto de dados dos metabólitos (SUMMER, 2003). Posteriormente, foi empregada uma Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), a qual permite a distinção entre os grupos de metabolomas. Para validação dessa análise, foram utilizados os índices Q^2 (previsibilidade do modelo) e R^2 (variância explicada). A discriminação dos perfis metabólicos entre os ambientes foi realizada utilizando-se o escore VIP (*Variable Importance in Projection*) superior a 1,0 (Xia et al. 2015), proveniente da própria PLS-DA. Esse escore permite selecionar os metabólitos que mais contribuíram para a diferença dos metabolomas entre os ambientes nos exercícios de baixa e alta intensidade.

Esses procedimentos relativos às análises do metaboloma foram conduzidos utilizando o sistema MetaboAnalyst (www.metaboanalyst.ca), o qual permite realizar várias análises relativas a dados extraídos da análise de metabolômica. Essa é uma ferramenta grátis, de fácil utilização e sem necessidade de *download* (XIA et al., 2015).

6.3 Resultados

6.3.1 Concentração dos poluentes

A comparação das concentrações de $PM_{2,5}$, PM_{TOTAL} , NO e NO_2 entre os ambientes limpo e poluído para os exercícios de alta e baixa intensidade está representada na figura 2. Para todos os poluentes analisados, a concentração foi significativamente maior no ambiente poluído comparado ao limpo nas duas intensidades de exercício ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa para o mesmo ambiente em intensidades diferentes.

Figura 2. Concentração dos poluentes por ambiente. Painel A: exercício de baixa intensidade; Painel B: exercício de alta intensidade. $PM_{2,5}$: material particulado com diâmetro de 2,5 μm ou menor; PM_{TOTAL} : material particulado total. NO: óxido de nitrogênio; NO_2 : dióxido de nitrogênio. * Significativamente maior comparado ao mesmo poluente no ambiente limpo na mesma intensidade de exercício ($p < 0,05$).

6.3.2 Temperatura e umidade relativa do ar

A tabela 1 apresenta a temperatura e a umidade relativa do ar durante as sessões de exercício nos ambientes limpo e poluído. Não houve diferença significativa entre as sessões.

Tabela 1. Temperatura e umidade relativa do ar durante as sessões em ambiente limpo e poluído.

	Baixa intensidade		Alta intensidade	
	Limpo	Poluído	Limpo	Poluído
Temperatura (°C)	20,8 ± 0,5	20,3 ± 0,6	21,1 ± 0,3	20,7 ± 0,4
Umidade relativa do ar (%)	71 ± 3	70 ± 3	70 ± 4	72 ± 2

Os dados estão apresentados como médias ± desvios-padrão.

6.3.3 Frequência cardíaca e ventilação

A frequência cardíaca, além de reportada, foi também utilizada para a estimação da VE, semelhantemente ao realizado por Nyhan et al. (2014), durante os exercícios de baixa e alta intensidade em ambos os ambientes. Não houve diferença significativa entre os ambientes limpo e poluído para nenhum dos dois parâmetros. Tanto a FC quanto a VE foi significativamente maior no exercício de alta intensidade em ambos os ambientes (figuras 3 e 4).

Figura 3. Frequência cardíaca por ambiente nos exercícios de baixa intensidade (painel A) e alta intensidade (painel B).

Figura 4. Ventilação por ambiente nos exercícios de baixa intensidade (painel A) e alta intensidade (painel B).

6.3.4 Percepção subjetiva de esforço

A percepção subjetiva de esforço, determinada através da escala de Borg (BORG, 1988), foi reportada logo após os 30 minutos de exercício. A percepção subjetiva de esforço foi significativamente maior no exercício de alta intensidade em ambos os ambientes ($p < 0,05$). Contudo, não houve diferença entre os ambientes na mesma intensidade de exercício (figura 5).

Figura 5. Percepção subjetiva de esforço após os 30 minutos de exercício em baixa intensidade e alta intensidade por ambiente.

6.3.5 Pressão arterial

Os valores da pressão arterial sistólica e diastólica foram mensurados nos momentos pré e logo após os 30 minutos de exercício. Não houve diferença significativa no comportamento da PA tanto em relação ao ambiente quanto em relação à intensidade (figura 6).

Figura 6. Delta da pressão arterial sistólica e diastólica por ambiente. Painel A: exercício de baixa intensidade; painel B: exercício de alta intensidade.

6.3.6 Variabilidade da frequência cardíaca

A variabilidade da frequência cardíaca foi mensurada durante toda a duração de cada teste. Para as análises, foram selecionadas janelas de 10 minutos nos momentos pré-exercício, aos 30 minutos de exercício e pós-exercício. Não foram observadas diferenças significativas para nenhum dos momentos entre os ambientes limpo e poluído (tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca nos exercícios de baixa e alta intensidade por ambiente (n = 10).

	Baixa intensidade					
	Limpo			Poluído		
	Pré	30	Pós	pré	30	Pós
Média RR	918,8 ± 125,9	473,4 ± 65,3	779,7 ± 124,5	942,7 ± 164,0	527,6 ± 119,0	756,8 ± 183,0
SDNN	85,1 ± 26,2	12,7 ± 4,8	66,6 ± 26,8	75,6 ± 29,4	21,5 ± 24,2	69,2 ± 33,6
RMSSD	61,0 ± 24,9	4,6 ± 1,7	32,7 ± 16,0	59,2 ± 40,2	9,4 ± 13,1	39,1 ± 20,9
pNN50	35,1 ± 18,7	0,0 ± 0,0	18,7 ± 13,5	30,5 ± 22,0	2,8 ± 8,4	18,3 ± 15,2
LF	1867,0 ± 1321,4	43,4 ± 56,7	1392,5 ± 1012,9	1371,3 ± 991,6	245,7 ± 574,0	1115,33 ± 628,3
HF	1275,5 ± 1019,7	5,6 ± 7,6	579,7 ± 479,6	1450,0 ± 2059,0	9,3 ± 15,2	622,0 ± 633,7
LF/HF	1,8 ± 1,1	9,0 ± 5,4	3,5 ± 2,6	2,3 ± 2,6	7,3 ± 3,6	4,8 ± 5,5
SD1	43,2 ± 17,6	3,3 ± 1,2	27,1 ± 12,1	41,9 ± 28,5	6,6 ± 9,3	27,6 ± 14,8
SD2	111,9 ± 33,6	17,6 ± 6,9	90,0 ± 36,5	97,9 ± 33,3	29,7 ± 33,0	93,6 ± 45,7
	Alta intensidade					
	Limpo			Poluído		
	Pré	30	Pós	pré	30	Pós
Média RR	954,9 ± 160,7	398,1 ± 56,7	685,4 ± 137,9	962,5 ± 155,9	409,6 ± 48,4	702,4 ± 112,5
SDNN	90,7 ± 29,8	8,4 ± 2,7	45,1 ± 22,4	100,1 ± 43,5	11,3 ± 5,4	42,9 ± 16,5
RMSSD	70,4 ± 39,4	3,6 ± 1,2	21,2 ± 17,0	68,7 ± 42,7	3,4 ± 1,0	22,9 ± 15,1
pNN50	37,6 ± 18,5	0,0 ± 0,0	7,6 ± 12,6	34,5 ± 23,3	0,0 ± 0,0	7,9 ± 12,9
LF	1620,9 ± 965,3	6,8 ± 9,1	703,9 ± 756,3	1575,1 ± 926,1	11,8 ± 19,2	516,2 ± 303,7
HF	1063,3 ± 815,8	1,5 ± 3,1	231,0 ± 333,6	1108,8 ± 1031,8	1,4 ± 2,5	228,9 ± 298,9
LF/HF	1,6 ± 0,9	7,5 ± 4,9	6,9 ± 5,9	2,5 ± 2,4	11,4 ± 8,9	6,2 ± 6,2
SD1	49,8 ± 27,9	2,6 ± 0,9	15,0 ± 12,0	48,6 ± 30,2	2,4 ± 0,7	16,2 ± 10,7
SD2	117,2 ± 34,4	11,5 ± 3,9	61,7 ± 29,8	131,8 ± 56,5	15,7 ± 7,8	58,1 ± 21,3

Os valores estão apresentados como médias ± desvios-padrão.

6.3.7 Citocinas sanguíneas

A concentração sanguínea das citocinas foi mensurada nos momentos pré e logo após os 30 minutos de exercício. Na tabela 3 estão apresentados os valores de fold change no momento 30 em relação ao pré. Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações das citocinas entre as diferentes intensidades de exercício, assim como entre os ambientes limpo e poluído.

Tabela 3. Fold change das interleucinas sanguíneas nos diferentes momentos por ambiente (n = 10).

	Baixa intensidade		Alta intensidade	
	Limpo	Poluído	Limpo	Poluído
IL-6	0,80 ± 0,49	1,05 ± 0,27	1,16 ± 0,36	1,42 ± 1,18
TNF- α	0,68 ± 0,46	1,13 ± 0,57	1,34 ± 1,21	2,03 ± 2,39
IL-1	1,24 ± 1,11	1,11 ± 0,91	1,54 ± 1,05	1,52 ± 1,22
VEGF	1,45 ± 1,41	1,11 ± 0,81	3,17 ± 2,93	1,89 ± 1,64
MCP1	6,91 ± 3,31	10,44 ± 7,62	5,34 ± 6,43	6,16 ± 3,92
MIP1	2,70 ± 5,94	1,23 ± 1,04	2,10 ± 1,71	1,13 ± 0,71
IL-10	0,71 ± 0,43	0,83 ± 0,26	4,17 ± 6,47	1,08 ± 0,29

Os valores estão apresentados como médias ± desvios-padrão do fold-change em relação ao momento pré.

6.3.8 Análise exploratória do metaboloma

Previamente às análises estatísticas dos dados do metaboloma, os dados foram normalizados através da técnica de Pareto scaling, a qual consiste em uma centralização pela média e divisão pela raiz quadrada do desvio-padrão de cada variável. A figura 7 mostra um exemplo da alteração nos dados após a normalização.

Figura 7. Comportamento e boxplot dos dados após o processo de normalização.

6.3.9 Metaboloma no exercício de baixa intensidade

A análise de PCA não identificou a presença de *outliers* (figura 8). Considerando-se os intervalos de confiança, nenhuma amostra foi retirada das análises posteriores. Em conjunto, os dois componentes principais selecionados pela análise explicam 38,6% da variância dos dados.

Figura 8. Análise de PCA do perfil metabolômico após 30 minutos de exercício por ambiente. Δ perfis metabolômicos em ambiente limpo; + perfis metabolômicos em ambiente poluído.

A figura 9 mostra a distribuição dos perfis metabolômicos de acordo com o ambiente aos 30 minutos de exercício após a realização da análise de PLS-DA. É possível observar distribuições distintas dos perfis metabólicos nos ambientes limpo e poluído. A análise de PLS-DA apresentou acurácia de 0,25, R^2 de 0,66 e Q^2 1,1.

Figura 9. Análise de PLS-DA do perfil metabolômico após 30 minutos de exercício por ambiente. ○ perfis metabolômicos em ambiente limpo; ● perfis metabolômicos em ambiente poluído.

Foram selecionados 17 metabólitos com valor de VIP score superior a 1. Na tabela 4 estão apresentados os metabólitos selecionados, os valores de VIP score e os valores de p das comparações das concentrações desses metabólitos entre os ambientes limpo e poluído em 30 minutos de exercício.

Tabela 4. Metabólitos selecionados na análise de PLS-DA como mais capazes de diferenciar o metaboloma em ambiente limpo e poluído na baixa intensidade (n = 10).

Metabólito	VIP score	Fold change		Principal	Vias
		Limpo	Poluído		Principal
Isoleucina	2,1	1,03	0,87	Aminoácidos	Metabolismo de valina, leucina e isoleucina
Glutamina	1,8	0,81	0,99		Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato
Metionina	1,7	0,83	0,58		Metabolismo de cisteína e metionina
Ornitina	1,6	1,07	0,43		Ciclo da ureia
2-hidroxibutirato	1,5	1,03	0,79		Metabolismo de metionina, cisteína e taurina
Malonato	1,5	0,53	0,71		Metabolismo de glicina, serina e treonina
Metilsuccinato	1,3	1,11	0,93		Metabolismo de metionina, cisteína e taurina
Treonina	1,1	0,78	0,94		Metabolismo de glicina, serina e treonina
3-hidroxi-3-metilglutarato	1,5	4,41	2,40		Metabolismo de mevalonato
Fosfocolina	1,5	1,39	1,01	Lipídios	Metabolismo de fosfolipídios
Acetona	2,1	0,59	0,95		Metabolismo de corpos cetônicos
Succinato	1,1	1,91	1,41	Energético	Ciclo do ácido tricarboxílico
4-Piridoxato	2,0	0,66	7,77	Ácido carboxílico	Álcoois e polióis, aminas, Aromáticos, Vitaminas e cofatores
Dimetil Sulfona	1,8	1,24	0,78	Componentes sulfurados	#N/D
2-metilglutarato	1,4	0,97	0,66	#N/D	#N/D

Os valores de VIP score são apresentados sem unidade; os valores de fold change se referem ao valor da concentração de cada metabólito no momento pós dividido pela concentração pré-exercício. #N/D: não consta na base HMDB.

6.3.10 Metaboloma no exercício de alta intensidade

A análise de PCA não identificou a presença de *outliers* (figura 10). Considerando-se os intervalos de confiança, nenhuma amostra foi retirada das análises posteriores. Em conjunto, os dois componentes principais selecionados pela análise explicam 35,9% da variância dos dados.

Figura 10. Análise de PCA do perfil metabolômico após 30 minutos de exercício em alta intensidade por ambiente. Δ perfis metabolômicos em ambiente limpo; + perfis metabolômicos em ambiente poluído.

A figura 11 mostra a distribuição dos perfis metabolômicos de acordo com o ambiente aos 30 minutos de exercício em alta intensidade após a realização da análise de PLS-DA. É possível observar distribuições distintas dos perfis metabólicos nos ambientes limpo e poluído. A análise de PLS-DA apresentou acurácia de 0,40, R^2 de 0,79 e Q^2 0,56.

Figura 11. Análise de PLS-DA do perfil metabolômico após 30 minutos de exercício por ambiente. ○ perfis metabolômicos em ambiente limpo; ● perfis metabolômicos em ambiente poluído.

Foram selecionados 16 metabólitos com valor de VIP score superior a 1. Na tabela 5 estão apresentados os metabólitos selecionados, os valores de VIP score e os valores de p das comparações das concentrações desses metabólitos entre os ambientes limpo e poluído em 30 minutos de exercício em alta intensidade.

Tabela 5. Metabólitos selecionados na análise de PLS-DA como mais capazes de diferenciar o metaboloma em ambiente limpo e poluído na alta intensidade (n = 10).

Metabólito	VIP score	Fold change		Principal	Vias
		Limpo	Poluído		
2-hidroxiisovalerato	2,83	1,07	0,82	Aminoácidos	Metabolismo de leucina, isoleucina e valina
3-hidroxiisovalerato	2,29	1,09	0,68		Metabolismo de leucina, isoleucina e valina
Lisina	1,93	0,60	0,74		Metabolismo da lisina
2-hidroxiisovalerato	1,21	1,19	0,82		Metabolismo de leucina, isoleucina e valina
N,N-dimetilglicina	1,10	0,96	1,28		Metabolismo de glicina, serina e treonina
2-hidroxiisovalerato	1,07	1,25	0,98		Metabolismo de metionina, cisteína e taurina
Prolina	1,04	0,95	1,07		Ciclo da ureia, metabolismo de arginina e prolina
Metilmalonato	2,79	3,64	3,23	Lipídios	Metabolismo de ácidos graxos
Carnitina	1,37	1,66	0,90		Metabolismo da carnitina
Fosfocolina	1,20	1,05	0,95		Metabolismo de fosfolipídios
Acetilcarnitina	1,92	1,46	1,31	Aminoácidos, lipídios e energético	Metabolismo de alanina e aspartato, transporte de lipídios
Succinato	1,08	1,61	1,14	Energético	Ciclo do ATC
1,3-dimetilurato	1,26	0,95	0,75	Xenobióticos	Metabolismo da xantina
N-nitrosodimetilamina	2,64	0,76	1,26	#N/D	#N/D
N-acetilcisteína	1,53	0,72	0,33		#N/D

Os valores de VIP score são apresentados sem unidade; os valores de fold change se referem ao valor da concentração de cada metabólito no momento pós dividido pela concentração pré-exercício. #N/D: não consta na base HMDB.

6.3.11 Metabólitos de diferenciação entre os ambientes para cada intensidade

Para fins de comparação, a tabela 6 traz reunidos os metabólitos VIP em cada um dos momentos, os quais foram responsáveis por diferenciar o metaboloma entre o ambiente limpo e poluído.

Tabela 6. Principais metabólitos responsáveis pela diferenciação do metaboloma no ambiente poluído em comparação ao ambiente limpo nos exercícios de baixa e alta intensidade.

Baixa intensidade	Alta intensidade
Aumentados	
Glutamina	Lisina
Malonato	N,N-dimetilglicina
Treonina	Prolina
Acetona	N-nitrosodimetilamina
4-piridoxato	
Diminuídos	
Isoleucina	2-hidroxiisovalerato
2-hidroxibutirato	2-hidroxibutirato
Metionina	3-hidroxiisovalerato
Ornitina	2-hidroxivalerato
Metilsuccinato	Carnitina
3-hidroxi-3-metilglutarato	Fosfocolina
Fosfocolina	Succinato
Succinato	1,3-dimetilurato
Dimetilsulfona	N-acetilcisteína
2-metilglutarato	Metilmalonato

Os metabólitos estão separados entre os que se apresentaram aumentados ou diminuídos no ambiente poluído em relação ao ambiente limpo de acordo com o VIP score.

6.4 Discussão

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de verificar a influência da intensidade do exercício realizado em ambiente poluído sobre parâmetros cardiorrespiratórios e em uma análise exploratória do metaboloma. Um número grande de estudos já demonstrou que a exposição à poluição atmosférica é capaz de afetar negativamente diferentes processos fisiológicos tanto no repouso (SEATON et al., 1995; MARINO et al., 2015) quanto durante o exercício (CUTRUFELLO et al., 2012; GILES et al., 2014). Por outro lado, nenhum estudo investigou se exercício de diferentes durações poderia gerar respostas distintas ao ambiente poluído, uma vez que o aumento na duração do exercício eleva a ventilação pulmonar, podendo assim elevar a quantidade de poluentes inalados. Ao contrário do que se esperava, nenhuma das variáveis analisadas apresentou diferenças significativas entre os exercícios de baixa e alta intensidade. Por um lado, é possível que determinadas características dos exercícios de intensidade mais elevada possam explicar esses achados. Por sua vez, a análise exploratória do metaboloma permitiu a observação da resposta de diferentes metabólitos ao ambiente poluído em baixa e alta intensidade, apontando vias interessantes da possível cascata de efeitos da poluição atmosférica nessas duas intensidades de exercício.

6.4.1 Qualidade do ar nas diferentes condições

Assim como no estudo apresentado anteriormente, foi possível observar que a simulação de dois ambientes significativamente distintos quanto à qualidade do ar foi realizada com sucesso, também gerando um ambiente considerado limpo e um com concentrações elevadas de poluentes segundo a classificação da OMS (WHO, 2005) tanto no exercício de baixa quanto no de alta intensidade. Outro ponto importante foi que as concentrações dos poluentes no ar foram similares no ambiente limpo entre as duas intensidades de exercício, assim como também no ambiente poluído. Dessa forma, assim como no estudo anterior, é possível considerar a análise dos efeitos da poluição atmosférica que, apesar de não apresentar níveis tão elevados quanto em pesquisas prévias (GHIO; DEVLIN, 2001; GILES et al., 2012), representam a poluição real enfrentada pelos cidadãos residentes na cidade de São Paulo.

6.4.2 Parâmetros cardiovasculares e percepção subjetiva de esforço

A FC foi significativamente maior no exercício de alta intensidade comparado ao de baixa intensidade em ambos os ambientes, o que mostra que o protocolo foi adequado para

caracterizar dois exercícios com intensidades claramente distintas. Contudo, não houve diferença significativa na FC entre os ambientes para nenhuma das intensidades. Sabe-se que o exercício provoca um aumento da FC em relação aos valores de repouso, o que se torna mais evidente com o aumento da intensidade e está relacionado a uma maior ativação do sistema nervoso simpático (CARTER; RAY, 2015). Estudos prévios demonstraram que a exposição à poluição atmosférica pode também aumentar a ativação simpática (NYHAN et al., 2014). Assim, é possível que o aumento simpático inerente ao exercício possa estar mascarando um possível efeito da poluição atmosférica que, ao menos nos níveis observados, deve ter uma menor magnitude. Outro possível mecanismo através do qual a FC poderia estar aumentada no ambiente poluído seria pelo aumento do stiffness arterial induzido pela poluição (UNOSSON et al., 2013). Esse aumento poderia aumentar a resistência vascular periférica, obrigando o coração a fazer um maior número de contrações para manter o débito cardíaco. Porém, a vasodilatação periférica induzida pelo exercício (GIELEN et al., 2011) pode estar atuando de maneira compensatória sobre esse mecanismo, ao menos para o período de exercício analisado.

A VE foi estimada através da FC. Portanto, a VE também foi significativamente maior no exercício de maior intensidade, porém sem diferenças significativas entre os ambientes. A maior VE no exercício de alta intensidade aponta para uma maior inalação de poluentes nessa condição. Como já foi mostrado por pesquisas anteriores, alguns malefícios da poluição podem ser dose-dependentes (SCHELEGLE; ADAMS, 1986), essa diferença entre as intensidades era importante. Por outro lado, o fato de o ambiente não ter influenciado na VE em nenhuma das intensidades de exercício pode ser explicado através de mecanismos associados ao exercício. Por exemplo, é esperado um aumento na VE de maior magnitude apenas pela realização do exercício em comparação com o estresse imposto pelos poluentes do ar isoladamente. Dessa forma, é possível que esse seja mais um efeito da poluição atmosférica sendo mascarado agudamente pelo exercício físico. Além disso, esse mecanismo pode até mesmo estar mascarando o efeito de uma maior dose de poluentes inalados no exercício de alta intensidade.

Também sinalizando a clara diferença entre as intensidades de exercício, a PSE foi significativamente maior após o exercício de alta intensidade. Porém, assim como a FC e a VE, a PSE não mostrou diferenças significativas de acordo com o ambiente. Ainda não é bem estabelecido de que maneira a poluição atmosférica pode modular a PSE, apesar de achados prévios terem mostrado que possivelmente os indivíduos podem apresentar a percepção de esforço aumentada na presença de poluentes (SCHELEGLE; ADAMS, 1986). Somado a isso,

há também o fato de os participantes serem residentes na cidade de São Paulo, estando expostos a níveis de poluição aos quais já estavam habituados.

Os parâmetros da VFC não apresentaram diferenças significativas entre os ambientes para nenhuma das duas intensidades de exercício. Resultados obtidos em estudos anteriores mostraram uma maior ativação simpática em ambiente poluído comparado ao ambiente limpo através da VFC (NYHAN et al., 2014; COLE-HUNTER et al., 2016). Contudo, Giles et al. (2014) também não verificaram diferenças em parâmetros ventilatórios e de percepção subjetiva entre exercícios de baixa e alta intensidade em ambiente poluído. Como discutido por esses autores, o exercício por si só é capaz de aumentar a ativação simpática e a consequente liberação de catecolaminas na corrente sanguínea (ZOUHAL et al., 2008), o que aumenta ainda mais em intensidades elevadas (FISHER et al., 2015). Com isso, é possível que o mecanismo intrínseco do exercício possa estar mascarando alguns efeitos agudos da poluição sobre o sistema nervoso autônomo.

Similar ao observado para as demais variáveis cardiovasculares, a resposta da PA ao ambiente poluído também não apresentou diferenças significativas entre os exercícios de diferentes intensidades. Após os 30 minutos de exercício em baixa intensidade, para ambos os ambientes, houve uma discreta diminuição na PA. Inversamente, foi observado um leve aumento na PA após o exercício de alta intensidade em ambos os ambientes. Porém, essas diferenças não foram suficientes para atingir significância estatística. Esse comportamento já era esperado devido a dois fatores: 1) efeito hipotensor pós-exercício, principalmente de baixa intensidade (KENNEY; SEALS, 1993) e 2) maior aumento da PA durante o exercício com o aumento da intensidade (BOUTCHER; BOUTCHER, 2017). Esses próprios fatores são capazes também de explicar a ausência de diferença entre os ambientes. É possível que nos níveis de poluição testados, o efeito do exercício na modulação da PA tenha uma maior magnitude em comparação à composição do ar. Apesar desse não ser um objetivo da presente tese, é possível especular que esse achado pode apontar o exercício como um meio eficaz de atenuar os efeitos hipertensivos causados pela exposição crônica à poluição atmosférica (GIORGINI et al., 2016).

6.4.3 Comportamento das citocinas sanguíneas

Não foram observadas diferenças significativas para nenhuma das citocinas analisadas, seja em resposta ao ambiente seja em resposta à intensidade do exercício. É comum a observação da alteração de algumas dessas citocinas em resposta à exposição à poluição atmosférica, como a IL-6 e a IL-10 (BRUCKER et al., 2013). Contudo, os estudos que

observaram tais alterações utilizaram janelas maiores de análise. Por exemplo, Brucker et al. 2013 analisaram tais marcadores em taxistas que permaneciam expostos por cerca de 8 horas diárias aos poluentes. Similarmente, Wu et al. (2016) também observaram alterações nesses marcadores em decorrência da exposição crônica. Dessa forma, esse tópico aponta uma limitação importante no desenho utilizado para as nossas análises. Como a análise das citocinas foi realizada apenas nos momentos pré e logo após o exercício, é possível que os efeitos mais pronunciados estejam aparecendo apenas em momentos posteriores. Infelizmente, essa limitação reduz também a possibilidade de discussão desses resultados, uma vez que não seria correto assumir a real ausência de diferença entre as situações apenas com as análises realizadas.

Seria possível, com cautela, sugerir que o tempo de exercício, mesmo em alta intensidade, não foi suficiente para induzir uma inalação de poluentes capaz de desencadear uma resposta inflamatória. Como visto no estudo 1, no qual as alterações nas citocinas foram observadas apenas após 90 minutos de exercício, é possível que os 30 minutos de exercício induzam uma menor resposta do sistema imune mesmo em uma intensidade de exercício mais elevada. Contudo, não é possível defender com clareza esse raciocínio pela ausência de dados pós-exercício.

6.4.4 Metaboloma

Em relação ao metaboloma, foi observado que grupos distintos de metabólitos diferenciaram os ambientes limpo e poluído nos exercícios de baixa e alta intensidade. Em um primeiro momento, como é feito em grande parte dos estudos que utilizam a metabolômica como ferramenta de investigação, é interessante analisar o comportamento dos metabólitos em relação às vias energéticas, ou seja, como o ambiente poluído pode estar afetando a bioenergética durante o exercício físico. Em seguida, foi feita uma associação dos metabólitos com alterações em vias já sabidamente afetadas pela poluição atmosférica, como estresse oxidativo e inflamação. Em toda a discussão sobre as alterações no metaboloma, por questões didáticas, optamos por destacar as alterações que foram observadas no ambiente poluído em relação ao ambiente limpo.

6.4.5 Metaboloma e bioenergética

Analisando-se o comportamento dos metabólitos após o exercício de baixa intensidade, é possível observar alterações no ambiente poluído capazes de sugerir mudanças no funcionamento das vias energéticas. Um dos traços observados foi o metabolismo

incompleto de lipídios. Tal fato pode ser apontado pelo aumento na concentração sanguínea de acetona, produto final do metabolismo de corpos cetônicos, e pela diminuição da concentração do 3-hidroxi-3-metilglutarato. Esse metabolismo direcionado para a cetogênese aponta, em primeiro lugar, para uma formação de acetil-CoA em uma taxa mais elevada do que a sua capacidade de ser utilizada no próximo passo da via energética, que é o ciclo de Krebs. De fato, foi observada também uma diminuição no succinato, um dos intermediários do ciclo, assim como do metilsuccinato, um de seus precursores, e do 2-metilglutarato, formado a partir do succinato. Além disso, houve também diminuições nas concentrações sanguíneas de aminoácidos precursores de outros intermediários do ciclo de Krebs, como a isoleucina e a metionina, e outros compostos envolvidos em vias capazes de alterar o conteúdo disponível desses e outros aminoácidos, como a ornitina e o 2-hidroxibutirato. Por outro lado, houve aumento da treonina, um aminoácido essencial capaz de favorecer a síntese de outros aminoácidos precursores de intermediários das vias energéticas. Posteriormente, analisando-se ainda o último passo da via oxidativa, a cadeia de transporte de elétrons (CTE), foi observado um aumento na concentração sanguínea de malonato. Sabendo-se que o malonato possui uma função inibitória sobre o complexo II da CTE (WOJTOVICH et al., 2013), é possível sugerir que o aumento desse metabólito é capaz de diminuir a taxa de formação de ATP através dessa via, podendo alterar também os processos anteriores.

Por sua vez, no exercício de alta intensidade, houve metabólitos similares e distintos, em comparação ao exercício de baixa intensidade, diferenciando os ambientes. Em primeiro lugar, como na baixa intensidade, parece que a poluição atmosférica atuou fortemente sobre o metabolismo de proteínas e aminoácidos. Por um lado, as diminuições do 2-hidroxibutirato, 2-hidroxiisovalerato e 3-hidroxiisovalerato indicam uma menor biodisponibilidade de aminoácidos para atuarem na formação de intermediários do ciclo de Krebs e até mesmo na conversão direta de energia em ATP e também um possível aumento na degradação de proteínas. Por outro lado, o aumento na lisina e na prolina podem sinalizar um aumento de aminoácidos para essas vias supracitadas. Particularmente, sabe-se que a lisina é o aminoácido no qual as proteínas que sofrem hidrólise no músculo esquelético são convertidas, sendo encaminhado para desaminação no fígado. Dessa forma, esse aumento na lisina pode também sugerir um aumento da proteólise muscular. Como observado também na baixa intensidade, a diminuição do succinato, um intermediário do ciclo de Krebs, aponta para uma possível diminuição da velocidade do ciclo, obtendo um menor gradiente de prótons para a geração de ATP pela cadeia de transporte de elétrons. Por fim, houve também diminuição na carnitina. Esse metabólito atua no transporte de ácidos graxos para o interior da mitocôndria

no processo da β -oxidação. Dessa forma, sua diminuição pode refletir uma diminuição da utilização de ácidos graxos como fonte energética no ambiente poluído.

6.4.6 Metaboloma, inflamação, estresse oxidativo e outras alterações biológicas

Além dos processos bioenergéticos, é possível também inferir sobre alterações em outras vias importantes e já conhecidamente afetadas pela presença de poluentes atmosféricos nos diferentes momentos analisados.

6.4.6.1 Baixa intensidade

Inicialmente, foi observada uma diminuição em conjunto da metionina, 2-hidroxiutirato e metilsuccinato, todos envolvidos no metabolismo da cisteína. Entre outros, um dos produtos formados nessa via metabólica é a glutatona. A glutatona tem um papel importante na regulação de uma vasta gama de processos, como ações antioxidantes, eritropoiese, leucopoiese e, conseqüentemente, na função do sistema imune e em processos inflamatórios (LIU et al., 2014). Assim, uma menor síntese de glutatona pode indicar uma menor capacidade do organismo de regular processos inflamatórios e de estresse oxidativo, já mostrados como efeitos da poluição atmosférica (GILES; KOEHLE, 2014; CUTRUFELLO et al., 2012).

Outra observação interessante foi a alteração de metabólitos relacionados ao sistema imunológico. Por exemplo, a diminuição na concentração sanguínea de fosfolipídios no ambiente poluído poderia ser interpretada como positiva, devido à ligação desse metabólito com a resposta inflamatória (FROSTEGARD, 2013). Contudo, esse fosfolipídio parece ser importante na ativação inicial da resposta imune, necessária para o combate de infecções, como na pneumonia (HERGOTT et al., 2015). Assim, essa diminuição na fosfolipídios pode caracterizar um impedimento da resposta aos poluentes inalados. Além disso, a fosfolipídios é um importante componente da membrana de células endoteliais e da substância surfactante alveolar. Portanto, a diminuição na fosfolipídios no ambiente poluído pode indicar uma diminuição da proteção tanto nas vias aéreas de condução quanto na região dos alvéolos (BARITUSSIO, 2004).

Paralelamente, foi observado um aumento no 4-piridoxato, o produto catabólico da vitamina B6. A menor disponibilidade de vitamina B6 no organismo já foi associada um quadro sistêmico de inflamação (UELAND et al., 2016) e a doenças cardiovasculares (SPINNEKER et al., 2007). Dessa forma, o aumento no 4-piridoxato no ambiente poluído

pode sugerir um menor tempo de meia-vida da vitamina B6 com a inalação de poluentes, o que pode favorecer as consequências negativas da diminuição dessa vitamina no organismo.

Finalmente, também após o exercício de baixa intensidade em ambiente poluído, houve aumento da glutamina e da treonina. O aumento desses aminoácidos pode estar relacionado ao aumento da atividade imune, uma vez que são importantes ativadores do sistema imune (LI et al., 2007; SIKALIDIS, 2015). Dessa forma, essa pode ser uma tentativa inicial de resposta ao estresse imposto pela presença de poluentes no ar inspirado e, conseqüentemente, nos alvéolos e na corrente sanguínea.

6.4.6.2 Alta intensidade

Similar ao observado no exercício de baixa intensidade, após o exercício de alta intensidade no ambiente poluído parece ter havido uma diminuição na via de formação da glutatona. Porém, na alta intensidade, por diminuições nas concentrações sanguíneas de 2-hidroxi butirato e n-acetilcisteína. Dessa forma, a via da glutatona parece ser afetada pela presença de poluentes independente da intensidade do exercício.

Houve também diminuição nas concentrações de 2-hidroxiisovalerato e 3-hidroxiisovalerato. O isômero 2 é originado na via cetogênica, estando, portanto, relacionado a processos de estresse oxidativo. Assim, sua diminuição pode ser interpretada como positiva, podendo significar também a diminuição desses processos. Por sua vez, o isômero 3 é também conhecido como HM β e está relacionado à biossíntese mitocondrial por ser precursor do PGC-1 α (XI et al., 2015). Além disso, é também capaz de sinalizar aumento na síntese e diminuição na degradação de proteínas (PORTAL et al., 2010). Portanto, sua diminuição pode se associar a um prejuízo nesses processos.

Assim como os anteriores, verificou-se também diminuição nas concentrações de 1,3-dimetilurato e carnitina no ambiente poluído. Enquanto a diminuição no 1,3-dimetilurato pode diminuir também a proteção contra a peroxidação lipídica decorrente do estresse oxidativo (Small Molecule Pathway Database), a redução na carnitina pode prejudicar o controle da glicemia e da lipídemia (VIDAL-CASARIEGO et al., 2013), assim como prejudicar a função do miocárdio por uma menor disponibilidade desse metabólito para o funcionamento das células musculares cardíacas (DINICOLANTÔNIO et al., 2014).

Contrariamente, foi observado um aumento na N-nitrosodimetilamina no ambiente poluído. Sabe-se que a doses elevadas esse metabólito é tóxico e apresenta possíveis efeitos carcinogênicos e hepatotóxicos (SHORT, 1993). Curiosamente, esse composto pode estar presente no ar como partícula em suspensão (HUTCHINGS et al., 2010), sugerindo que sua

presença no sangue possa também ter fonte exógena e podendo ser uma importante indicação de que os poluentes do ar estariam atingindo a corrente sanguínea.

6.5 Conclusão

Os resultados do presente estudo trouxeram alguns resultados diferentes do que se esperava, mas não menos interessantes. De acordo com nossa hipótese, no ambiente poluído, era de se esperar que o exercício de alta intensidade provocasse malefícios em maior magnitude comparado com o de baixa intensidade, devido a um maior aumento da ventilação e, conseqüentemente, na inalação de poluentes. Porém, nenhuma alteração cardiovascular foi observada em maior grau no exercício de alta intensidade.

É preciso ressaltar que algumas limitações do presente estudo podem ter mascarado a observação de alguns resultados, como o momento de avaliação das citocinas marcadoras de inflamação. Contudo, ainda assim, os nossos resultados podem sugerir que o aumento da intensidade do exercício, ao menos no nível testado, não resultou em maiores efeitos deletérios da poluição do ar.

Como resultados anteriores mostram que exercícios de maiores intensidade são capazes de gerar mais benefícios em curtas durações de treinamento, nossos resultados podem ser atraentes na medida em que podem servir para que indivíduos expostos a níveis elevados de poluição atmosférica maximizem suas adaptações ao treinamento minimizando os efeitos da poluição do ar. Em conjunto com os resultados do estudo 1, que mostraram aumento da pressão arterial e da inflamação após 90 minutos de exercício, esse estudo sugere que, vivendo em níveis mais elevados de poluição, talvez o exercício possa ser utilizado em períodos mais curtos e com intensidades mais intensas para promover os benefícios desejados.

7 LIMITAÇÕES

A presente Tese de Doutorado apresenta algumas limitações que justificam apresentação e breve discussão. Por exemplo, foi adotado um ambiente poluído relativo ao ambiente externo à sala de coletas, ou seja, a qualidade do ar próximo ao ambiente no qual foram realizados os procedimentos experimentais. Isso fez com que não fosse possível observar concentrações dos poluentes em magnitudes extremamente elevadas, como feito em alguns estudos que manipularam os poluentes do ar. Isso pode ter sido responsável pela ausência de diferenças significativas entre os ambientes para algumas variáveis. Contudo, permitiu analisar os efeitos aos quais os habitantes da cidade de São Paulo estão realmente expostos, aumentando consideravelmente a validade ecológica do estudo. Além disso, com os equipamentos disponíveis, foi possível mensurar apenas quatro poluentes atmosféricos e, como se sabe, a poluição nas grandes cidades é composta por uma grande variedade de substâncias no ar. Por outro lado, o $PM_{2,5}$, poluente mais relacionado a efeitos deletérios à saúde, foi mensurado com sucesso em todas as sessões experimentais.

Quanto à nossa amostra, todos os indivíduos eram jovens, saudáveis e residentes em São Paulo, ou seja, já estavam habituados à exposição aos níveis de poluição obtidos. Além disso, não caracterizavam uma população com maior susceptibilidade aos efeitos dos poluentes inalados. Porém, apesar de poder diminuir a chance de observação de diferenças significativas, a utilização dessa população com baixo risco pode ser considerado um fator de reforço aos nossos resultados, uma vez que os efeitos observados podem ser esperados ainda em maiores magnitudes em populações mais susceptíveis, como idosos e indivíduos portadores de asma, por exemplo. Por fim, como uma limitação de caráter mais técnico, a análise das citocinas sanguíneas poderia ter sido realizada em mais pontos após o término do exercício, uma vez que essas moléculas apresentam um tempo de atraso em sua resposta. Essa limitação pode ter influenciado principalmente na análise da inflamação nos exercícios de menor duração (30 minutos).

8 CONCLUSÃO GERAL

Com base nos achados e limitações do presente estudo, pode-se concluir que:

- A poluição atmosférica parece capaz de inibir o efeito hipotensor após um exercício de 90 minutos em intensidade moderada, causando um aumento da pressão arterial após a realização do exercício. Esse resultado possui considerável relevância, haja vista a alta taxa de hipertensão na população e a capacidade do exercício em combatê-la.
- Após 90 minutos de exercício em ambiente poluído, o quadro inflamatório pode estar agravado, tanto pelo aumento de fatores pró-inflamatórios quanto pela diminuição da proteção anti-inflamatória. Esse resultado mostra que a exposição à poluição atmosférica durante um exercício de longa duração é capaz, como ocorreu na pressão arterial, de competir com um efeito benéfico do exercício.
- A poluição atmosférica é capaz de influenciar o metaboloma durante o exercício de diferentes maneiras ao longo do tempo. Apesar de existirem vias similarmente afetadas, a duração do exercício pareceu um fator importante nas respostas biológicas ao ambiente poluído. Dessa forma, os níveis de poluição do ar devem ser considerados para a prática de atividades físicas.
- Ao menos nos níveis de poluição testados, a presença de poluentes no ar não foi capaz de afetar os parâmetros cardiorrespiratórios mensurados. É possível que maiores níveis de poluição, ou mesmo maiores durações de exercício, sejam necessários para alterar significativamente esses parâmetros.
- A intensidade do exercício parece não ter sido determinante nas respostas fisiológicas à poluição atmosférica. É possível que a menor duração utilizada no exercício de maior intensidade tenha resultado em uma menor inalação total de poluentes, apesar da maior ventilação minuto. Por isso, é interessante que pesquisas subsequentes analisem o efeito da intensidade em maiores durações de exercício.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. **Journal of Pineal Research**, v. 30(2), p. 65-74, 2001.
- ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. **Current Topics on Medical Chemistry**, v. 11(2), p. 221-40, 2011.
- AKDIS et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor b, and TNF-a: Receptors, functions, and roles in diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138(4), p. 984-1010, 2016.
- ALEMSEGED, Z. et al. A juvenile early hominin skeleton from Dikika, Ethiopia. **Nature**. v. 443(7109), p. 296-301, 2006.
- ALLRED, E.N. et al. Effects of carbon monoxide on myocardial ischemia. **Environmental Health Perspectives**, v. 91, p. 89-132, 1991.
- ALONSO, J.R. et al. Carbon monoxide specifically inhibits cytochrome C oxidase of human mitochondrial respiratory chain. **Pharmacology & Toxicology**, v. 93, p. 142-6, 2003.
- ANDERSON, E.W. et al. Effect of low-level carbon monoxide exposure on onset and duration of angina pectoris. A study in ten patients with ischemic heart disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 79(1), p. 46-50, 1973.
- ARIS, R.M. et al. Ozone-induced airway inflammation in human subjects as determined by airway lavage and biopsy. **American Reviews of Respiratory Disease**, v. 148, p. 1363-72, 1993.
- AVOL, E.L. et al. Acute respiratory effects of Los Angeles smog in continuously exercising adults. **Journal of Air Pollution Control Association**, v. 33(11), p. 1055-60, 1983.
- AYDIN, S. et al. The effects of air pollutants on nasal functions of outdoor runners. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 271(4), p. 713-7, 2014.
- BACH, N. et al. Cytokine responses induced by diesel exhaust particles are suppressed by PAR-2 silencing and antioxidant treatment, and driven by polar and non-polar soluble constituents. **Toxicology Letters**, v. 238(2), p. 72-82. 2015.
- BARITUSSIO, A. Lung surfactant, asthma, and allergens: a story in evolution. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 169(5), p. 550-1, 2004.
- BELL, M.L.; DAVIS, D.L. Reassessment of the lethal London fog of 1952: novel indicators of acute and chronic consequences of acute exposure to air pollution. **Environmental Health Perspective**, v. 109 Suppl 3, p. 389-94, 2001.
- BELL, M.L.; ZANOBBETTI, A.; DOMINICI, F. Who is more affected by ozone pollution? A systematic review and meta-analysis. **American Journal of Epidemiology**, v. 180(1), p. 15-28, 2014.
- BELLAVIA, A. et al. DNA hypomethylation, ambient particulate matter, and increased blood pressure: findings from controlled human exposure experiments. **Journal of American Heart Association**, v. 2(3):e000212, 2013.
- BLOCK, M.L.; CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L. Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. **Trends in Neuroscience**, v. 32(9), p. 506-16, 2009.
- BOS, I. et al. Physical activity, air pollution and the brain. **Sports Medicine**, v. 44(11), p. 1505-18, 2014.
- BOUTCHER, Y.N.; BOUTCHER, S.H. Exercise intensity and hypertension: what's new? **Journal of Human Hypertension**, v. 31(3), p. 157-164, 2017.
- BRAUER, M. et al. Exposure of chronic obstructive pulmonary disease patients to particles: respiratory and cardiovascular health effects. **Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology**, v. 11(6), p. 490-500, 2001.

- BRAUN-FAHRLÄNDER, C. et al. Acute effects of ambient ozone on respiratory function of Swiss schoolchildren after a 10-minute heavy exercise. **Pediatric Pulmonology**, v. 17(3), p. 169-77, 1994.
- BROWER, J.B. et al. Metabolomic changes in murine serum following inhalation exposure to gasoline and diesel engine emissions. **Inhaled Toxicology**, v. 28(5), p. 241-50, 2016.
- BRUCKER, N. et al. Atherosclerotic process in taxi drivers occupationally exposed to air pollution and co-morbidities. **Environmental Research**, v. 131, p. 31-8, 2014.
- BRUCKER, N. et al. Biomarkers of occupational exposure to air pollution, inflammation and oxidative damage in taxi drivers. **Science of Total Environmental**, v. 463-464, p. 884-93, 2013.
- BRUGNARA, L. et al. Metabolomics approach for analyzing the effects of exercise in subjects with type 1 diabetes mellitus. **PLoS One**, v. 7(7):e40600, 2012.
- BUTEAU, S.; GOLDBERG, M.S. A structured review of panel studies used to investigate associations between ambient air pollution and heart rate variability. **Environmental Research**, v. 148, p. 207-47, 2016.
- BUTEAU, S.; GOLDBERG, M.S. Methodological issues related to pooling results from panel studies of heart rate variability and its association with ambient air pollution. **Environmental Research**, v. 140, p. 462-5, 2015.
- CAMPOS-FERRAZ, P.L. et al. Exploratory studies of the potential anti-cancer effects of creatine. **Amino Acids**, v. 48(8), p. 1993-2001, 2016.
- CARTER, J.R.; RAY, C.A. Sympathetic neural adaptations to exercise training in humans. **Autonomic Neuroscience**, v. 188, p. 36-43, 2015.
- CHEN, B.; KAN, H. Air pollution and population health: a global challenge. **Environmental Health Preventive Medicine**, v. 13(2), p. 94-101, 2008.
- CHHIBBER-GOEL, J. et al. The complex metabolism of trimethylamine in humans: endogenous and exogenous sources. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 18:e8, 2016.
- CIPOLLA-NETO, J. et al. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. **Journal of Pineal Research**, v. 56(4), p. 371-81, 2014.
- CUTRUFELLO, P.T.; SMOLIGA, J.M.; RUNDELL, K.W. Small things make a big difference: particulate matter and exercise. **Sports Medicine**, v. 42(12), p. 1041-1058, 2012.
- D'ALESSANDRO, A. et al. Clinical metabolomics: the next stage of clinical biochemistry. **Blood transfusion**, v. 10 Suppl 2, p 19-24, 2012.
- DETTMER, K.; ARONOV, P.A.; HAMMOCK, B.D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, p. 51-78, 2007.
- DINICOLANTONIO, J.J. et al. L-carnitine for the treatment of acute myocardial infarction. **Reviews of Cardiovascular Medicine**, v. 15(1), p. 52-62, 2014.
- EMWAS, A.H.M. et al. NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: applications, limitations, and recommendations. **Metabolomics**, v. 9(5), p. 1048-1072, 2013.
- ENEAS, C. et al. H NMR based metabolomics approach for exploring urinary metabolome modifications after acute and chronic physical exercise. **Anal Bioanal Chem**, v. 396(3), p. 1167-76, 2010.
- EZE, I.C. et al. Long-Term Exposure to Ambient Air Pollution and Metabolic Syndrome in Adults. **PLoS One**, v. 10(6):e0130337, 2015.
- FERDINANDS, J.M. et al. Breath acidification in adolescent runners exposed to atmospheric pollution: a prospective, repeated measures observational study. **Environmental Health**, 7:10, 2008.
- FISHER, J.P.; YOUNG, C.N.; FADEL, P.J. Autonomic adjustments to exercise in humans. **Comprehensive Physiology**, v. 5(2), p. 475-512, 2015.

- FLOURIS, A.D. et al. Respiratory and immune response to maximal physical exertion following exposure to secondhand smoke in healthy adults. **Plos One**, v. 7(2):e31880, 2012.
- FOGELHOLM, M. et al. International Physical Activity Questionnaire: Validity against fitness. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 38(4), p. 753-60, 2006.
- FOLINSBEE, L.J.; HAZUCHA, M.J. Time course of response to ozone exposure in healthy adult females. **Inhaled Toxicology**, v. 12(3), p. 151–67, 2000.
- FROSTEGÅRD J. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. **BMC Medicine**, v. 11, 2013.
- FRY, R.C. et al. Air toxics and epigenetic effects: ozone altered microRNAs in the sputum on human subjects. **American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology**, v. 306, p. 1129-37, 2014.
- FUKUOKA, Y. et al. The effects of exercise intensity on thermoregulatory responses to exercise in women. **Physiology & Behavior**, v. 76(4-5), p. 567-74, 2002.
- GANG, H. et al. Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to allcause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men in women. **Archives of Internal Medicine**, v. 164, p. 1066–1076, 2004.
- GERAETS, L. et al. Inhibition of acute pulmonary and systemic inflammation by 1,7-dimethylxanthine. **European Journal of Pharmacology**, v. 629(1-3), p. 132-9, 2010.
- GERBER, D.A. Low free serum histidine concentration in rheumatoid arthritis. A measure of disease activity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 55(6), p. 1164-73, 1975.
- GHIO, A.J. et al. Controlled human exposures to diesel exhaust. **Swiss Medical Weekly**, 142:w13597, 2012.
- GHIO, A.J.; DEVLIN, R.B. Inflammatory lung injury after bronchial instillation of air pollution particles. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 164(4), p. 704-8, 2001.
- GIELEN, S. et al. Exercise-induced modulation of endothelial nitric oxide production. **Current Pharmacology Biotechnologies**, v. 12(9), p. 1375-84, 2011.
- GILES, L.V. et al. Physiological responses to diesel exhaust exposure are modified by cycling intensity. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 46(10), p. 1999-2006, 2014.
- GILES, L.V.; CARLSTEN, C.; KOEHLE, M.S. The effect of pre-exercise diesel exhaust exposure on cycling performance and cardio-respiratory variables. **Inhaled Toxicology**, v. 24(12), p. 783-9, 2012.
- GILES, L.V.; KOEHLE, M.S. The health effects of exercising in air pollution. **Sports Medicine**, v. 44, p. 223-49, 2014.
- GIORGINI, P. et al. Air Pollution Exposure and Blood Pressure: An Updated Review of the Literature. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22(1), p. 28-51, 2016.
- GOLD, D.R. et al. Ambient pollution and heart rate variability. **Circulation**, v. 101(11), p. 1267-73, 2000.
- GONG, H.JR. et al. Impaired exercise performance and pulmonary function in elite cyclists during low-level ozone exposure in a hot environment. **American Reviews of Respiratory Disease**, v. 134, p. 726–733, 1986.
- GREEN, D.J. Exercise training as vascular medicine: direct impacts on the vasculature in humans. **Exercise and Sports Sciences Reviews**, v. 37(4), p. 196-202, 2009.
- GRINESKI, S.E.; COLLINS, T.W.; CHAKRABORTY, J. Hispanic heterogeneity and environmental injustice: Intra-ethnic patterns of exposure to cancer risks from traffic-related air pollution in Miami. **Populational Environment**, v. 35(1), p. 26-44, 2013.
- HAMPEL, R. et al. Acute air pollution effects on heart rate variability are modified by SNPs involved in cardiac rhythm in individuals with diabetes or impaired glucose tolerance. **Environmental Research**, v. 112, p. 177-85, 2012.

- HASEGAWA, S. et al. Cysteine, histidine and glycine exhibit anti-inflammatory effects in human coronary arterial endothelial cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 167, p. 269-274, 2011.
- HE, X. et al. β -Hydroxy- β -methylbutyrate, mitochondrial biogenesis, and skeletal muscle health. **Amino Acids**, v. 48(3), p. 653-64, 2016.
- HERGOTT, C.B. et al. Bacterial exploitation of phosphorylcholine mimicry suppresses inflammation to promote airway infection. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125(10), p. 3878-90, 2015.
- HIGASHIKAWA, F. et al. 5-aminolevulinic acid, a precursor of heme, reduces both fasting and postprandial glucose levels in mildly hyperglycemic subjects. **Nutrition**, v. 29(7-8), p. 1030-6, 2013.
- HINTON, P.S.; NIGH, P.; THYFAULT, J. Effectiveness of resistance training or jumping-exercise to increase bone mineral density in men with low bone mass: A 12-month randomized, clinical trial. **Bone**, v. 79, p. 203-12, 2015.
- HOFFMANN, E.D.E.; STROOBANT, V. Mass Spectrometry - Principles and Applications. [s.l: s.n.]. v. 29.
- HUNTER, C.A.; JONES, S.A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nature Immunology**, v. 16(5), p. 448-57, 2015.
- HUTCHINGS, J.W. et al. N-nitrosodimethylamine occurrence, formation and cycling in clouds and fogs. **Environmental Science and Technology**, v. 44(21), p. 8128-33, 2010.
- INT PANIS, L. et al. Experimental exposure to diesel exhaust increases arterial stiffness in man. *Particle and Fibre Toxicology*, 6:7, 2009.
- INT PANIS, L. et al. Exposure to particulate matter in traffic: A comparison of cyclists and car passengers. **Atmospheric Environment**, v. 44, p. 2263-70, 2010.
- JACOBS, L. et al. Subclinical responses in healthy cyclists briefly exposed to traffic-related air pollution: an intervention study. **Environmental Health**, v. 9:64, 2010.
- JERRETT, M. et al. Traffic-related air pollution and obesity formation in children: a longitudinal, multilevel analysis. **Environmental Health**, v. 13:49, 2014.
- JERRETT, M. Global geographies of injustice in traffic-related air pollution exposure. **Epidemiology**, v. 20(2), p. 231-3, 2009.
- JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, p. 65-87, 2011.
- JUNG, J. et al. Serum metabolomics reveals pathways and biomarkers associated with asthma pathogenesis. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 43(4), p. 425-33, 2013.
- JUNGES, J.R.; SELLI, L. Bioethics and environment: a hermeneutic approach. **International Journal of Bioethique**, v. 19(1-2), p. 105-19, 198-9, 2008.
- KARGARFARD, M. et al. Effects of polluted air on cardiovascular and hematological parameters after progressive maximal aerobic exercise. **Lung**, v. 193(2), p. 275-81, 2015.
- KENNEY, M.J.; SEALS, D.R. Postexercise hypotension. Key features, mechanisms, and clinical significance. **Hypertension**, v. 22(5), p. 653-64, 1993.
- KLEINMAN, M.T. et al. Urban angina in the mountains: effects of carbon monoxide and mild hypoxemia on subjects with chronic stable angina. **Archives of Environmental Health**, v. 53(6), p. 388-97, 1998.
- KNAB, A.M. et al. Effects of a flavonoid-rich juice on inflammation, oxidative stress, and immunity in elite swimmers: a metabolomics-based approach. **International Journal of Sports Nutritional Exercise Metabolism**, v. 23(2), p. 150-60, 2013.
- KOKKINOS, P.; MYERS, J. Exercise and physical activity: clinical outcomes and applications. **Circulation**, v. 122(16), p. 1637-48, 2010.

- KUBESCH, N. et al. Arterial blood pressure responses to short-term exposure to low and high traffic-related air pollution with and without moderate physical activity. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 22(5), p. 548-57, 2015.
- LAKKA, H.M. et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. **JAMA**, v. 288, p. 2709-2716, 2002.
- LANKI, T. et al. Can we identify sources of fine particles responsible for exercise-induced ischemia on days with elevated air pollution? The ULTRA study. **Environmental Health Perspectives**, v. 114(5), p. 655-60, 2006.
- LATHAM, A.M. et al. An integrative model for vascular endothelial growth factor A as a tumour biomarker. **Integrative Biology (Camb)**, v. 2(9), p. 397-407, 2010.
- LI, P. et al. Amino acids and immune function. **British Journal of Nutrition**, v. 98(2), p. 237-52, 2007.
- LIM, S.S. et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380(9859), p. 2224-2260, 2012.
- MAGARI, S.R. et al. Association of heart rate variability with occupational and environmental exposure to particulate air pollution. **Circulation**, v. 104(9), p. 986-91, 2001.
- MANNISTO, T. et al. Acute and recent air pollution exposure and cardiovascular events at labour and delivery. **Heart**, v. 101(18), p. 1491-8, 2015.
- MCCONNELL, R. et al. A longitudinal cohort study of body mass index and childhood exposure to secondhand tobacco smoke and air pollution: the Southern California Children's Health Study. **Environmental Health Perspectives**, v. 123(4), p. 360-6, 2015.
- MCCONNELL, R. et al. Asthma in exercising children exposed to ozone: a cohort study. **Lancet**, v. 359(9304), p. 386-91, 2002.
- MCCRATY, R.; SHAFFER, F. Heart rate variability: new perspectives on physiological mechanisms, assessment of self-regulatory capacity, and health risk. **Global Advances in Health and Medicine**, v. 4(1), p. 46-61, 2015.
- MEO, S.A. et al. Effect of environmental air pollution on type 2 diabetes mellitus. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19(1), p. 123-8, 2015.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6ª edição. Artmed. 2014.
- NIEMAN, D.C. et al. Chia seed supplementation and disease risk factors in overweight women: a metabolomics investigation. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 18(7), p. 700-8, 2012.
- NIEMAN, D.C. et al. Metabolomics approach to assessing plasma 13- and 9-hydroxy-octadecadienoic acid and linoleic acid metabolite responses to 75-km cycling. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 307(1), p. R68-74, 2014.
- NIEMAN, D.C. et al. Metabolomics-Based Analysis of Banana and Pear Ingestion on Exercise Performance and Recovery. **Journal of Proteome Research**, v. 14(12), p. 5367-77, 2015.
- NIEMAN, D.C. et al. Serum metabolic signatures induced by a three-day intensified exercise period persist after 14 h of recovery in runners. **Journal of Proteome Research**, v. 12(10), p. 4577-84, 2013.
- NIINIMAA, V. et al. The switching point from nasal to oronasal breathing. **Respiratory Physiology**, v. 42(1), p. 61-71, 1980.
- NISHIDA, Y. Inhibition of lipid peroxidation by methylated analogues of uric acid. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacology**, v. 43(12), p. 885-7, 1991.

- NYHAN, M.; MCNABOLA, A.; MISSTEAR, B. Comparison of particulate matter dose and acute heart rate variability response in cyclists, pedestrians, bus and train passengers. **Science of the Total Environment**, v. 468-469, p. 821-31, 2014.
- PADILLA, J. et al. Vascular effects of exercise: endothelial adaptations beyond active muscle beds. **Physiology (Bethesda)**, v. 26(3), p. 132-45, 2011.
- PAFFENBARGER, R.S. Jr. et al. Physical activity, all-cause mortality, and longevity of college alumni. **New England Journal of Medicine**, v. 314(10), p. 605-13, 1986.
- PARK, S.K. et al. Long-term exposure to air pollution and type 2 diabetes mellitus in a multiethnic cohort. **American Journal of Epidemiology**, v. 181(5), p. 327-36, 2015.
- PEARCE, J.L. et al. Exploring associations between multipollutant day types and asthma morbidity: epidemiologic applications of self-organizing map ambient air quality classifications. **Environmental Health**, v. 14:55, 2015.
- PEKKANEN, J. et al. Particulate air pollution and risk of ST-segment depression during repeated submaximal exercise tests among subjects with coronary heart disease. **Circulation**, v. 106(8), p. 933-8, 2002.
- PETERS, A. et al. Exposure to traffic and the onset of myocardial infarction. **New England Journal of Medicine**, v. 351(17), p. 1721-30, 2004.
- PETERSON, J.W. et al. Anti-inflammatory and antisecretory potential of histidine in Salmonella-challenged mouse small intestine. **Laboratory Investigation**, v. 78(5), p. 523-34, 1998.
- PORTAL, S. et al. Effect of HMB supplementation on body composition, fitness, hormonal profile and muscle damage indices. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 23(7), p. 641-50, 2010.
- PSYCHOGIOS, N. et al. The human serum metabolome. **PLoS One**, v. 6(2):e16957, 2011.
- QASIM, N.; MAHMOOD, R. Diminution of Oxidative Damage to Human Erythrocytes and Lymphocytes by Creatine: Possible Role of Creatine in Blood. **PLoS One**, v. 10(11):e0141975, 2015.
- RAMAKRISHNAN, S.; ANAND, V.; ROY, S. Vascular endothelial growth factor signaling in hypoxia and inflammation. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 9(2), p. 142-60, 2014.
- REZENDE BARBOSA, M.P. et al. Impact of functional training on cardiac autonomic modulation, cardiopulmonary parameters and quality of life in healthy women. **Clinical Physiology and Functional Imaging**, v. 36(4), p. 318-25, 2015.
- RIESBERG, L.A. et al. Beyond muscles: The untapped potential of creatine. **Internal Immunopharmacology**, v. 37, p. 31-42, 2016.
- ROMERO, A. et al. A review of metal-catalyzed molecular damage: protection by melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 56(4), p. 343-70, 2014.
- RYAN, D.; ROBARDS, K. Metabolomics: The greatest omics of them all? **Analytical Chemistry**, v. 78(23), p. 7954-7958, 2006.
- SAKAO, S. et al. Determinants of an elevated pulmonary arterial pressure in patients with pulmonary arterial hypertension. **Respiratory Research**, v. 16:84, 2015.
- SAMET, J.M.; GRUSKIN, S. Air pollution, health, and human rights. **Lancet Respiratory Medicine**, v. 3(2), p. 98-100, 2015.
- SCHARF, M. et al. Myocardial adaptation to high-intensity (interval) training in previously untrained men with a longitudinal cardiovascular magnetic resonance imaging study (Running Study and Heart Trial). **Circulatory and Cardiovascular Imaging**, v. 8(4), 2015.
- SCHELEGLE, E.S.; ADAMS, W.C. Reduced exercise time in competitive simulations consequent to low level ozone exposure. **Medicine and Science in Sport and Exercise**, v. 18(4), p. 408-14, 1986.

- SEATON, A. et al. Particulate air pollution and acute health effects. **Lancet**, v. 345(8943), p. 176-8, 1995.
- SHARMAN, J.E.; COCKCROFT, J.R.; COOMBES, J.S. Cardiovascular implications of exposure to traffic air pollution during exercise. **QJM**, v. 97(10), p. 637-43, 2004.
- SHEEHAN, P.M.; YEH, Y.Y. Pulmonary surfactant lipid synthesis from ketone bodies, lactate and glucose in newborn rats. **Lipids**, v. 20(12), p. 835-41, 1985.
- SHIELDS, K.N. et al. Traffic-related air pollution exposures and changes in heart rate variability in Mexico City: a panel study. **Environmental Health**, v. 12:7, 2013.
- SHORT, B.G. Cell proliferation and renal carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 101 Suppl 5, p. 115-20, 1993.
- SIKALIDIS, A.K. Amino acids and immune response: a role for cysteine, glutamine, phenylalanine, tryptophan and arginine in T-cell function and cancer? **Pathology & Oncology Research**, v. 21, p. 9-17, 2015.
- SLAWSON, C.; HOUSLEY, M.P.; HART, G.W. O-GlcNAc cycling: how a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks. **Journal of Cell Biochemistry**, v. 97(1), p. 71-83, 2006.
- SUH, H.H.; ZANOBETTI, A. Exposure error masks the relationship between traffic-related air pollution and heart rate variability. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 52(7), p. 685-92, 2010.
- SUWA, T. et al. Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 39(6), p. 935-42, 2002.
- SZCZEŚNIAK, K.A. et al. Dietary supplementation of β -hydroxy- β -methylbutyrate in animals - a review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99(3), p. 405-17, 2015.
- SZOSTAK, J.; LAURANT, P. The forgotten face of regular physical exercise: a 'natural' anti-atherogenic activity. **Clinical Science (Lond)**, v. 121(3), p. 91-106, 2011.
- TARVAINEN, M.P. et al. Kubios HRV – heart rate variability analysis software. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 113(1), p. 210-20, 2014.
- TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING ELECTROPHYSIOLOGY. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. **Circulation**, v. 93(5), p. 1043-65, 1996.
- TASKIRAN, D.; NESIL, T.; ALKAN, K. Mitochondrial oxidative stress in female and male rat brain after *ex vivo* carbon monoxide treatment. **Human Experimental Toxicology**, v. 26(8), p. 645-51, 2007.
- UNITED NATIONS. World urbanization prospectus the 2011 revision. 2012. http://esa.un.org/unup/pdf/WUP2011_Highlights.pdf.
- UNOSSON, J. et al. Exposure to wood smoke increases arterial stiffness and decreases heart rate variability in humans. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 10:20, 2013.
- US EPA. Acute exposure guidelines levels, carbon monoxide, 2008.
- USMAN, A. et al. From lipid retention to immune-mediate inflammation and associated angiogenesis in the pathogenesis of atherosclerosis. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 22(8), p. 739-49, 2015.
- VAN DEN BERG, L.E. et al. Safety and efficacy of exercise training in adults with Pompe disease: evaluation of endurance, muscle strength and core stability before and after a 12 week training program. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 10(1), p. 87, 2015.
- VIDAL-CASARIEGO, A. et al. Metabolic effects of L-carnitine on type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 121(4), p. 234-8, 2013.

- VIEHMANN, A. et al. Long-term residential exposure to urban air pollution, and repeated measures of systemic blood markers of inflammation and coagulation. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 72(9), p. 656-63, 2015.
- VIEIRA, R.P. et al. Anti-inflammatory effects of aerobic exercise in mice exposed to air pollution. **Medicine and Science in Sport and Exercise**, v. 44(7), p. 1227-34, 2012.
- WAUTERS, A. et al. At high cardiac output, diesel exhaust exposure increases pulmonary vascular resistance and decreases distensibility of pulmonary resistive vessels. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 309(12):H2137-44, 2015.
- WEI, Y. et al. Chronic exposure to air pollution particles increases the risk of obesity and metabolic syndrome: findings from a natural experiment in Beijing. **FASEB J**, v. 30(6), p. 2115-22, 2016.
- WHEELER, A. et al. The relationship between ambient air pollution and heart rate variability differs for individuals with heart and pulmonary disease. **Environmental Health Perspectives**, v. 114 (4), p. 560-566, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2016. Ambient air pollution database. Available at: <http://www.who.int/whr/2006/en/>
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Air quality guidelines global update Geneva; 2005. http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0005/78638/E90038.pdf
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global health risks. Mortality and burden of disease attributable to major risks. 2009.
- WU, S. et al. Short-term exposure to high ambient air pollution increases airway inflammation and respiratory symptoms in chronic obstructive pulmonary disease patients in Beijing, China. **Environ Int**, v. 94, p. 76-82, 2016.
- XIA, J. et al. MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, v. 43(W1):W251-7, 2015.
- YATERA, K. et al. Particulate matter air pollution exposure promotes recruitment of monocytes into atherosclerotic plaques. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 294:H944-53, 2008.
- ZOUHAL, H. et al. Catecholamines and the effects of exercise, training and gender. **Sports Medicine**, v. 38(5), p. 401-23, 2008.
- ZUURBIER, M. et al. Minute ventilation of cyclists, car and bus passengers: an experimental study. **Environmental Health**, v. 8:48, 2009.

ANEXOS - Anexo 1: Parecer circunstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

**ESCOLA DE EDUCAÇÃO
FÍSICA E ESPORTE DA
UNIVERSIDADE DE SÃO**

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Exercício e poluição atmosférica: influência da intensidade e da duração no perfil fisiológico resultante do exercício em ambiente poluído

Pesquisador: Rômulo Cássio de Moraes Bertuzzi

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 46954415.0.0000.5391

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.282.626

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa sobre exercícios físicos em ambiente poluído e não poluído. As atividades envolverão exercícios de esforço e testes de tempo limite no domínio muito pesado. A hipótese é que em ambiente poluído os exercícios induzirão respostas imunes, inflamatórias e metabólicas negativas em maior magnitude quando comparado aos exercícios em ambiente não-poluído.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a influência da intensidade e da duração do exercício em ambiente poluído.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos baixos. Há três desconfortos que a pesquisa poderá ocasionar: 1) náuseas, vômitos e enjôos decorrentes da exaustão voluntária e do teste de tempo limite; 2) a necessidade de jejum de 8h para a coleta de sangue; 3) desconfortos respiratórios ocasionados pela exposição à poluição. No entanto, como atenuantes são apresentadas estatísticas que apontam para incidência de menos de 1% no caso 1; é dada a opção de escolha do horário para o voluntário, o que diminui o desconforto de item 2; por fim, dados não apontam problemas decorrentes de exposição de curto prazo a ambientes poluídos, atenuando o desconforto do item 3. Quanto aos benefícios, os voluntários receberão os resultados de todos os testes.

Endereço: Av. Profº Mello Moraes, 65

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-030

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3097

Fax: (11)3812-4141

E-mail: cep39@usp.br

ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.282.626

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa bem fundamentada e clara quanto aos seus procedimentos metodológicos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Trata-se de um TCLE muito bem redigido, que esmiuça as informações necessárias para que os voluntários compreendam passo a passo as atividades a serem realizadas. Também expõe os desconfortos e os atenuantes, bem como os elementos que contribuirão para sua segurança,

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto exequível, bem delimitado, com TCLE adequada e apto a ser realizado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_540494.pdf	03/07/2015 15:57:12		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto detalhado.docx	03/07/2015 15:53:19		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	03/07/2015 13:23:30		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	03/07/2015 09:02:18		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Profº Mello Moraes, 65

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-030

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3097

Fax: (11)3812-4141

E-mail: cep39@usp.br

ESCOLA DE EDUCAÇÃO
FÍSICA E ESPORTE DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.282.626

SAO PAULO, 15 de Outubro de 2015

Assinado por:
Edilamar Menezes de
Oliveira
(Coordenador)

Endereço: Av. Profº Mello Moraes, 65

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-030

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3097

Fax: (11)3812-4141

E-mail: cep39@usp.br