UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Exercício intervalado de alta intensidade e poluição atmosférica: análise dos efeitos para o sistema cardiovascular, perfil inflamatório e metabólica

Ramon Cruz

São Paulo
2019

RAMON CRUZ

Exercício intervalado de alta intensidade e poluição atmosférica: análise dos efeitos para o sistema cardiovascular, perfil inflamatório e metabólica

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

Área de concentração: Estudos Biodinâmicos da Educação Física e Esporte

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Cássio de Moraes Bertuzzi

São Paulo

2019

Catálogo da Publicação
Serviço de Biblioteca
Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo

Cruz, Ramon

Exercício intervalado de alta intensidade e poluição
atmosférica: análise dos efeitos para o sistema cardiovascular,
perfil inflamatório e metabólica / Ramon Cruz. – São Paulo :
[s.n.], 2019.
105p.

Tese (Doutorado) - Escola de Educação Física e Esporte da
Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Cassio de Moraes Bertuzzi

1. Exercício aeróbio 2. Sistema cardiovascular I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: CRUZ, Ramon.

Título: Exercício intervalado de alta intensidade e poluição atmosférica: análise dos efeitos para o sistema cardiovascular, perfil inflamatório e metabólica.

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus heróis Rita de Cássia N da Cruz e João M da Cruz, dedico.

AGRADECIMENTOS

De todos os parágrafos da tese de doutorado, este é o mais importante. Agradeço à minha mãe Rita de Cássia e meu pai João Messias pelo incessável amor que dedicaram a mim. Tenho em mente, com muita clareza, que sou privilegiado e a parte mais fácil foi chegar até aqui. Difícil é ter coragem e brio para superar as barreiras sociais de um país desigual, e fazer com que os três filhos recebessem as melhores educação e formação possíveis. Vejo em meu pai a coragem de quem jamais desistiu, por maior que fosse o desafio, é o melhor homem que eu conheço. E em minha mãe vejo o resumo do que é o amor. Eu amo vocês.

Ao longo da vida dividi o banco de trás do velho fusquinha, caixas de chocolate, brigas e um amor incondicional com minhas irmãs Rô e Rafinha. Valeu meninas, amo vocês! Obrigado a Deus por essa família.

A minha grande família, pois sempre fizeram de sua casa uma extensão a minha. Em especial ao Tio Luiz (Pintor), Tia Marlene, as minhas primas/irmãs Vi e Amandinha; essa “pobraiada” me atura com carinho e quase sempre com paciência! Eu ainda não consegui entender como o Pintor consegue trabalhar de dia (pintor) e noite (guarda patrimonial), vocês são referência para mim. Uma lembrança especial as minhas avós Teresinha (*In Memoriam*) e Didita, vocês me proporcionaram uma infância memorável e saborosamente divertida. Agradeço também a Lucas e Claudia, pois se fazem minhas irmãs felizes, me fazem feliz também. Obrigado a família Santos, Inês, Paulo, Paula e Reinaldo por sempre me receberem tão bem. Ao meu afilhado/sobrinho Davi, como é bom te ouvir falando.

Agradeço à minha amada Myla Santos se 10 anos (ops, contando desde o mestrado, agora já são 15...) passaram e eu não percebi era porque estava entretido com seu sorriso. Durante o doutorado eu te fiz trabalhar sábados e domingos, montar figuras (perfeitas) para metabolômica, rodar análises bioquímicas no carnaval, hospedar amigos por longas semanas em sua casa, e ainda dizer em público que está comigo há alguns bons anos. Desconfio que você me ama (risos). Sempre me perguntam como ficamos tanto tempo juntos, a pergunta certa seria, como eu não ficaria?

Aos velhos e bons amigos de longa jornada, Francisco (Chicão), Bruno, Cristovao (Piolho), Danilo (Ventania), valeu por discussões acaloradas, risadas, partidas de futebol. Sinto muita falta dos nossos bons tempos no atletismo. Agradeço também aos “Trutas de Batalha” do GEDAE, Mayara, João, Marcelo, Arthur, André, Júlio, Marcelo, Beto, Johny, Patricia, Marcos, Kleiner. Em especial aos amigos Rafa e Léo, pela ajuda com o estudo piloto, análises e discussões (vocês já estão morrendo de saudades das análises de metabolômica em Campinas, não estão? Rs). Edu e Lucas, pela grande ajuda com as coletas de dados e pela coragem de me ajudarem com alguns testes, mesmo sem terem experiência com algumas medidas, valeu mesmo! Edson e Renata, por toda ajuda com os testes do Ladesp. Ao Pedrinho por todas as discussões sobre a metabolômica, Percília e Felipe Hardt pela ajuda com análises e coletas, respectivamente. À Maira e Guima (Gypsi-Lab) e RB *Station* pelo suporte com os medidores

Uma lembrança carinhosa aos atletas do CRIA Lavras e UFJF, obrigado por me deixarem fazer parte de umas das histórias mais lindas que um dia poderei contar e sempre me fazer lembrar do “*menino, moleque, que moram sempre no meu coração*”.

É imprescindível que eu agradeça aos mestres que me inspiram e contribuíram significativamente para minha formação. À professora do ensino fundamental-I, Valéria, grande responsável pela minha alfabetização. Ao prof. Paulo Fernando, obrigado por alterar o rumo da nossa história, você sempre será nossa referência do que é ser professor.

Agradeço ao meu primeiro orientador e principal culpado pela minha formação acadêmica. Ao Prof. e amigo Fernando de Oliveira. Do seu jeito, me mostrou que o importante é melhorar a pergunta e não obter respostas. Sinto falta das conversas, risadas e calorosas discussões! Obrigado. Preciso agradecer (e muito) a sua família, mas antes, Raquel, me desculpe por todo desfalque a sua dispensa, visitas inoportunas, longas e bagunças na cozinha. Obrigado por sempre me receberem como um filho! Ao professor e amigo Jorge Perrou, tomara que um dia eu tenha tanta calma e paciência para orientar (acho que não terei), obrigado pela receptividade em Juiz de Fora e colaborar imensamente com a minha formação.

Agradeço ao Prof. Maurício, pelas colaborações com o meu projeto, comentários no exame de qualificação, paciência para me explicar e supervisionar os procedimentos do RMN e metabolômica. À Prof. Mônica pela colaboração com o projeto, exame de qualificação e toda as “emergências” para conduzirmos o estudo. Obrigado ao Prof. Saldiva pelo apoio com os nossos projetos. Com imenso carinho agradeço também ao pessoal do Lim-33, Monique Matsuda e Pedro Martins, a competência e seriedade que vocês conduzem tudo é impressionante, eu espero sempre encontrar pessoas que resolvam problemas assim como vocês (vai ser difícil, rs

Durante a graduação o Prof. Fernando me falava sobre a elevada competência para atividades acadêmicas de dois ex-alunos dele. Agradeço ao Prof. Adriano Lima-Silva, além de ter vivenciado nos últimos anos que o Prof. Fernando estava certo, também valorizo e admiro seu trabalho na formação de novos professores, excelentes estudantes que eu tive o prazer de conviver. Obrigado pela colaboração nesse projeto, discussões, comentários e sugestões ao longo do processo de doutorado.

Obrigado Prof. Rômulo Bertuzzi, o Prof. Fernando também falava sobre você e sua competência, ficaremos sempre na dúvida se isso é bom ou ruim (risos). Lembre-se que a frase é padrão: “*Ôh negão, tem um cara bom para caramba aqui...*”. Você me proporcionou algo que julgo essencial para o pesquisador, liberdade para pensar. Obrigado por me incentivar a sempre fazer o melhor que eu pudesse, você tem uma parcela imensa de responsabilidade na minha formação acadêmica, e quem diria, até do outro lado do continente eu fui parar (risos) Muito obrigado!

I have to say thank you for two friends from Vancouver. Prof. Michael Koehle (Mike), Thank you to receive me so well in your Lab. When the things got tough (and they really did) you helped me without hesitation. I really appreciate my 6 weeks at the lab-home (hahaha). Further, thank you for all discussion, questions and improvement in my education! To my dear friend Sarah Koch. I'm honored to have you as my friend. You have a brave and giant heart! I always will remember all help that you provide to me. My period at University of British Columbia was terrific thanks to you, Mike and Sarah.

Ao programa de pós-graduação e funcionários da EEFEE USP. Obrigado a CAPES pela bolsa de doutorado. Aos voluntários que aceitaram participar com tanta disciplina e dedicação. Se esqueci de alguém, me desculpe. Eu só cheguei até aqui por ter recebido ajuda incondicional de várias pessoas. Então, agradeço à população brasileira que financiou minha educação. Eu sei que trabalhar para que mais pessoas tenham acesso ao ensino público de qualidade é minha missão de vida... Do fundo do coração, muito obrigado.

“Você não é todo mundo.”

D. Rita, de Cássia N. da Cruz

*“Um cientista persegue a pergunta, as crianças têm as melhores perguntas,
um bom cientista precisa ser uma criança.”*

Ramon Cruz

RESUMO

CRUZ, R. **Exercício intervalado de alta intensidade e poluição atmosférica: análise dos efeitos para o sistema cardiovascular, perfil inflamatório e metabólico.** 2019. Tese (Doutorado). Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2019.

A prática de exercícios físicos, com predominância aeróbia, pode trazer benefícios à saúde. Contudo, esses benefícios podem sofrer influência de um importante fator ambiental presente nos grandes centros urbanos: a poluição atmosférica. Durante a transição do repouso para o esforço físico há maior exposição aos poluentes, devido ao aumento da ventilação, elevando a quantidade total de poluentes atmosféricos que penetram nas vias aéreas. Assim, o objetivo da presente tese de doutorado foi analisar o impacto do exercício intervalado de alta intensidade sobre as respostas cardiovasculares, perfil inflamatório e metabólico, quando realizado em ambiente com poluição atmosférica. Quinze homens, saudáveis e fisicamente ativos participaram como voluntários (idade $28,0 \pm 6,0$ anos e VO_2max $46,3 \pm 9,5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Os participantes realizaram 5 visitas para o estudo principal, a primeira para realização do teste incremental máximo e mais quatro visitas para realização de exercício intervalado de alta intensidade (EIAI) e exercício contínuo de baixa intensidade (ECBI), sendo que cada exercício foi realizado uma vez em ambiente com ar poluído (AmbPol) e uma vez em ambiente com ar filtrado (AmbFil). Os principais resultados são: i. O EIAI realizado em AmbPol impactou negativamente a pressão arterial sistólica, inibindo o efeito hipotensor 10 minutos após exercício. ii. Levou à secreção de uma interleucina (IL) pró inflamatória (IL-6) e inibiu a ação anti-inflamatória da IL-10. iii. Para as análises de metabólico, houve alterações nas vias metabólicas associadas ao metabolismo de lipídios, com incompleto metabolismo dessa via energética e pronunciada produção de corpos cetônicos. Para o ECBI, o AmbPol impactou a pressão arterial, inibindo o efeito hipotensor 10 min após e 1 hora após. ii. Não houve alterações para as citocinas medidas. iii. Para o perfil metabólico, houve alteração para o metabolismo de lipídios, entretanto, sem produção de corpos cetônicos. Em conclusão, o EIAI realizado em ambiente poluído da cidade de São Paulo impactou a pressão arterial, prejudicou o balanço pró- e anti-inflamatório das IL-6 e -10, e alterou o metabolismo energético.

Palavras-chave: Exercício aeróbio, material particulado, pressão arterial, inflamação, metabolismo.

ABSTRACT

CRUZ, R. **High-intensity interval exercise and air pollution: analysis of effects for the cardiovascular system, inflammatory profile and metabolomics.** Thesis (Ph.D.). School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, 2019.

The practice of endurance exercises can promote health benefits. However, these benefits could be impaired by an important environmental condition: the air pollution from big cities. During the transition between the rest and physical effort there is a greater minute ventilation and therefore greater air pollution exposure and pollutants inhaled. In this sense the aim of this PhD thesis was to analyze the impact of the practice of high-intensity interval exercise for cardiovascular system, inflammatory profile and metabolomics; when performed in an air pollution environment. Fifteen healthy, physically active young men participated as volunteers (age 28.0 ± 6.0 years and VO_2max $46.3 \pm 9.5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). To the main study, the participants visited the laboratory in 5 opportunities, the first consisting of maximal incremental test and four visits for high intensity interval exercise (HIIE) and low-intensity continuous exercise (CONT). Each exercise was performed once in environment with polluted air (POLL) and once in environment with filtered air (FA). As the main findings: i. The HIIE performed in POLL inhibited the hypotensive effect 10-min after exercise. ii. Promote the secretion of a pro-inflammatory cytokine, the interleukine-6 (IL-6) and inhibited the anti-inflammatory action of the IL-10. iii. For the metabolomic profile, the metabolic pathways related with lipid metabolism were impaired, with incomplete metabolism of this energy pathway and pronounced production of ketone bodies. For the CONT, the POLL condition impaired the blood pressure, inhibiting the hypotensive effect 10-min after and 1-hour after exercise. ii. There were no significant statistic difference for the cytokines measured. iii. Considering the metabolomics analysis, the lipid metabolism was impaired, however, without production of ketone bodies. In conclusion, the HIIE performed in a polluted environment in the city of São Paulo impacted the blood pressure, impaired the pro- and anti-inflammatory balance of IL-6 and -10, and altered the energy metabolism.

Key words: Endurance exercise, particulate matter, blood pressure, inflammation, metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Trabalhos publicados e indexados na base de dados <i>Pubmed</i> entre os anos 1940 - 2010.	22
Figura 2 - Desenho experimental dos estudos Preliminar e Principal. TIM.....	44
Figura 3 - Ventilação (VE) e volume total inalado durante os exercícios EIAl.....	47
Figura 4 - Concentração dos poluentes nas sessões experimentais.	49
Figura 5 - Pressão arterial durante as sessões experimentais.	51
Figura 6 - Desenho experimental do estudo 2.	62
Figura 7 - Concentração dos poluentes nas sessões experimentais.	65
Figura 8 - Análises multivariadas para o exercício intervalado de alta intensidade.....	67
Figura 9 - Análises multivariadas para o exercício exercício contínuo de baixa intensidade..	70
Figura 10 – Análise de enriquecimento para cada exercício nos momentos 10 min e 1 hora após.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre as técnicas analíticas.	36
Tabela 2 - Variáveis cardiorrespiratórias do estudo preliminar.	48
Tabela 3 - Temperatura e umidade relativa do ar (UR).....	49
Tabela 4 - Concentrações das citocinas nas sessões de exercício intervalado de alta intensidade.	52
Tabela 5 - Concentrações das citocinas nas sessões de exercício contínuo de baixa intensidade.	53
Tabela 6 - Temperatura e umidade relativa do ar (UR).....	65
Tabela 7 - Metabólitos do exercício intervalado de alta intensidade – 10 min após.....	68
Tabela 8 – Metabólitos do exercício intervalado de alta intensidade – 1 hora após.	68
Tabela 9 - Metabólitos do exercício contínuo de baixa intensidade – 10 min após.	71
Tabela 10 - Metabólitos do exercício contínuo de baixa intensidade – 1 hora após.	71

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C. Graus Celsius

Acetil CoA. Acetil Coenzima – A

AmbFil. Ambiente com ar filtrado, Ambiente com ar filtrado

AmbPol. Ambiente com ar poluído

AUC. Area Under the Curve

CCI. Coeficiente de correlação Intraclass

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

cm. Centímetros

CO. Monóxido de Carbono

CV. Coeficiente de variação, Coeficiente de variação

ECBI. Exercício Contínuo de Baixa Intensidade

EFA. Exercício Física Aeróbica

EIAI. Exercício Intervalado de Alta Intensidade

FC. Frequência Cardíaca

HEPA. High Efficiency Particulate Arrestance

IL. Interleucina

kg. Quilos

L. Litros

material particulado. Material Particulado

min. Minutos

mm. Milímetro

mmHg. Milímetros de mercúrio

NO. Óxido Nítrico

NO₂. Dióxido de Nitrogênio

NO_x. Óxidos de nitrogênio

η². Eta ao quadrado

O₃. Ozônio

OMS. Organização Mundial da Saúde

ozônio. Ozônio

PA. Pressão Arterial

PAD. Pressão arterial diastólica

PAS. Pressão arterial sistólica

PCA. Principal Component Analysis

PLS-DA. Partial Least Square – Discriminant Analysis

Q². Capacidade do preditiva do modelo

R². Coeficiente de determinação

RMN. Ressonância Magnética Nuclear

SO₃. Óxido sulfúrico

TE. Tamanho do efeito

TFD. Taxa de falsa descoberta

TIM. teste incremental máximo

TNF- α . Fator de Necrose Tumoral - alfa

VE. Ventilação

VEGF. Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VIP. variable importance in the projection

vs. Versus

W. Watts

Δ . Delta

μm . Micrômetros

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I. Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa com humanos	93
ANEXO II. Etapas a percorrer para as análises de metabolômica	96
ANEXO III. Resumo das análises estatísticas	99

SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO.....	iii
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xii
LISTA DE ANEXOS	xiv
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVO GERAL	20
2.1. Objetivos específicos.....	20
3. CAPÍTULO I. Revisão da Literatura	21
3.1. Poluição atmosférica	21
3.1.1. Uma breve retrospectiva de eventos que impulsionaram a pesquisa científica..	21
3.1.2. Poluição atmosférica e saúde.....	22
3.1.3. Exercício físico aeróbio em ambientes poluídos	24
3.2. Exercício aeróbio intervalado.....	30
3.2.1. Do empirismo aos avanços científicos do treinamento esportivo	30
3.2.2. Aplicações práticas para o desempenho esportivo, atividade física e saúde	32
3.2.3. Comparação com exercício contínuo	34
3.3. Metabolômica.....	34
3.3.1. Do empirismo às modernas técnicas analíticas	34
3.3.2. Uma abordagem metabolômica para o exercício físico.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1. Poluentes atmosféricos e o contêiner de exposição	39
4.2. Medidas antropométricas	39
4.3. Teste incremental máximo	39
4.4. Protocolo de exercícios intervalado e contínuo.....	40
4.5. Coletas sanguíneas e preparação das amostras	40
5. CAPÍTULO II. Os benefícios para a saúde do exercício intervalado de alta intensidade podem ser mitigados pela poluição atmosférica da cidade de São Paulo?	41
5.1. Introdução.....	41
5.2. Materiais e métodos	43
5.2.1. Participantes	43
5.2.2. Desenho experimental	44
5.2.3. Medidas de ventilação e volume total inalado.....	45
5.2.4. Medidas cardiovasculares.....	45

5.2.5.	Perfil inflamatório	45
5.2.6.	Análises estatísticas	46
5.3.	Resultados	46
5.3.1.	Estudo preliminar	46
5.3.2.	Estudo principal.....	49
5.3.2.1.	Concentrações dos poluentes	49
5.3.2.2.	Pressão arterial e frequência cardíaca	50
5.3.2.3.	Perfil inflamatório	51
5.4.	Discussão.....	54
5.4.1.	Abordagem metodológica.....	54
5.4.2.	Pressão arterial e frequência cardíaca.....	55
5.4.3.	Perfil inflamatório	57
5.5.	Conclusão	58
6.	CAPÍTULO III. Exercício intervalado de alta intensidade e poluição atmosférica da cidade de São Paulo: Efeitos sobre vias metabólicas baseadas em uma abordagem metabolômica. ..	59
6.1.	Introdução.....	59
6.2.	Materiais e métodos	61
6.2.1.	Participantes	61
6.2.2.	Desenho experimental	61
6.2.3.	Aquisição do espectro e identificação dos metabólitos	62
6.2.4.	Análise dos metabólitos.....	62
6.2.5.	Determinação do erro técnico da medida de metabolômica.....	63
6.2.6.	Análises estatísticas	63
6.3.	Resultados	64
6.3.1.	Concentração dos poluentes	64
6.3.2.	Análises exploratória da metabolômica e vias metabólicas	65
6.3.3.	Exercício intervalado de alta intensidade	66
6.3.4.	Exercício contínuo de baixa intensidade	69
6.3.5.	Vias metabólicas afetadas pela poluição atmosférica	72
6.4.	Discussão.....	73
6.4.1.	Análises exploratória da metabolômica e vias metabólicas	73
6.4.2.	Exercício intervalado de alta intensidade	74
6.4.3.	Exercício contínuo de baixa intensidade	76
6.5.	Conclusão	77
7.	LIMITAÇÕES.....	78
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	80
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXOS.....	93

1. INTRODUÇÃO

Os exercícios físicos com predominância bioenergética aeróbia (EFA) são recomendados para promoção da saúde do sistema cardiovascular, para evitar a inflamação sistêmica e disfunções metabólicas (CORNELISSEN et al., 2010; GIBALA et al., 2012; GIBALA; MCGEE, 2008; HAALAND et al., 2008). Evidências prévias indicam que há menor probabilidade para o desenvolvimento de hipertensão ou infarto do miocárdio para pessoas fisicamente ativas (CORNELISSEN et al., 2010). Há também, menor ação de citocinas pró-inflamatórias, portanto, menor depressão do sistema imune (HAALAND et al., 2008). E ainda, menor propensão à obesidade e disfunções metabólicas relacionadas, como diabetes (EGAN; ZIERATH, 2013; GIBALA et al., 2012).

Dentre as variações possíveis de EFA, destacam-se, os exercícios intervalado com alta intensidade (nomeados daqui em diante, como EIAI) e o contínuo, com baixa intensidade (ECBI). A comunidade acadêmica tem se dedicado a entender como o EIAI pode potencializar os benefícios que os EFA podem promover. Por exemplo, o efeito hipotensor após exercício é maior se a intensidade do exercício também for elevada (HALLIWILL et al., 2013). Além disso, a intensidade do esforço físico parece estar associada com a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como Interleucina-10 (IL-10) (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008). Do ponto de vista metabólico, elevadas intensidades podem potencializar a sensibilidade à insulina, o que é um ponto chave para menor propensão à diabetes (DE SOUZA et al., 2018). Nesse sentido, o EIAI tornou-se atraente porque, por permitir momentos de pausa completa ou recuperação ativa, é possível que até mesmo indivíduos não atletas fiquem em alta intensidade por mais tempo (BILLAT, 2001), ao passo que de maneira contínua, não seria possível sustentar tanto tempo em alta intensidade. Adicionalmente, o tempo dedicado ao EIAI pode ser menor do que ao ECBI.

Controversamente, se por um lado o EIAI é positivo para saúde, por outro, um aspecto ambiental dos grandes centros urbanos pode mitigar esses efeitos, a poluição atmosférica. Sabe-se que a principal forma de contato com a poluição atmosférica ocorre pela ventilação (VE). Ao considerar que há uma relação direta e exponencial da intensidade do exercício com a VE (NYHAN; MCNABOLA; MISSTEAR, 2014; ZUURBIER et al., 2009), pode-se assumir que quanto maior a intensidade, maior será o volume total de poluentes inalados. Há também outros fatores que levam ao maior contato com poluentes, como: predominância da respiração oral; maiores frequência e profundidade respiratórias; dilatação dos brônquios, que pode permitir

maior deposição de poluentes e diminuição da temperatura do ar ventilado, causando ressecamento das mucosas nasal e traqueal (GILES; KOEHLE, 2014; GIORGINI et al., 2016).

Alguns estudos também foram conduzidos para tentar estabelecer a relação entre a exposição à poluentes e EFA. Por exemplo, um grupo de pesquisadores canadenses demonstrou que a exposição prévia ao material particulado em uma câmara gera maiores valores de frequência cardíaca (FC) durante um teste contrarrelógio de ciclismo de 20 km (GILES; CARLSTEN; KOEHLE, 2012). Entretanto, o mesmo grupo de pesquisadores não encontrou diferença para a pressão arterial (PA) e respostas metabólicas, quando houve exposição ao MP, após 30 minutos (min) de exercício contínuo em bicicleta (GILES et al., 2014, 2018). Outro estudo com a mesma abordagem metodológica para exposição dos voluntários (câmara de exposição), demonstrou que o metabolismo de lipídios é impactado pelo ozônio (O₃) e ainda, há elevada disfunção energética, o que foi sugerido pela produção de corpos cetônicos (MILLER et al., 2016).

Apesar dos importantes avanços proporcionados pelos estudos supracitados, algumas limitações podem ser apontadas. A abordagem metodológica usando câmaras de exposição aos poluentes é atraente porque permite o controle de mais variáveis associadas ao ambiente. Por exemplo, velocidade do vento, temperatura e umidade relativa do ar. Conjuntamente, essas variáveis podem interferir na concentração de materiais em ressuspensão, como o MP; e os gases, óxido nítrico (NO), dióxido de nitrogênio (NO₂). É preciso destacar também que os estudos geralmente utilizam apenas um poluente, o que pode ocultar os efeitos da exposição à saúde. Inclusive, esse fator foi indicado como possível razão para os resultados encontrados por Giles et al. (2014, 2018).

Dentre os principais poluentes dos grandes centros urbanos, como São Paulo, há os gases O₃, NO, NO₂ e monóxido de carbono (CO), com destaque para o MP. O MP é formado por partículas extremamente finas (da ordem de micrômetros - µm) e sua composição pode conter resíduos sólidos e líquidos suspensos no ar, sendo considerado como um dos principais poluentes promotores de impactos negativos à saúde (CUTRUFELLO; SMOLIGA e RUNDELL, 2012; OMS, 2016). Diversos estudos têm demonstrado sua associação com elevada taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares, como hipertensão (BAI; SUN, 2016; BROOK et al., 2010; DOCKERY et al., 1993); aumento de IL pró inflamatórias, como IL-6 (WOLF et al., 2016) e à disfunção metabólica, como o diabetes. Adicionalmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reporta que os efeitos negativos da exposição para a saúde são potencializados, quando há uma complexa mistura dos poluentes (OMS, 2005).

Assim, do ponto de vista metodológico para exposição, é recomendado a utilização da poluição atmosférica presente nas grandes cidades. Entretanto, outras limitações emergem a partir dessa abordagem experimental. O controle de variáveis ambientais é baixo, portanto, não somente os poluentes podem sofrer alterações; mas também variáveis fisiológicas, especialmente as cardiovasculares, como FC e PA e bioquímicas, como os marcadores de inflamação sistêmica. Adicionalmente, coletas de variáveis bioquímicas seriam inviáveis, por serem invasivas (e. g. coleta de sangue intravenoso) e por demandarem preparação imediata (centrifugação e armazenamento em baixas temperaturas).

Também deve-se considerar que ao entrar em contato com a poluição atmosférica, os prejuízos a saúde tornam-se sistêmicos. Nesse sentido, seria atraente considerar as medidas que representassem o estresse cardiovascular, o perfil inflamatório e o metabolismo. Nesse sentido, a técnica analítica metabolômica permite a avaliação de diversos metabólitos a partir de uma amostra de material biológico (e.g., sangue, saliva e suor) e com suporte de análises matemáticas robustas, é possível descrever inclusive como os metabólitos interagem frente à um agente estressor (NICHOLSON; LINDON, 2008). Em síntese, notadamente há um desafio metodológico para condução de estudos em que a exposição à poluição atmosférica está mais próxima a realidade dos grandes centros urbanos. Assim, preconiza-se que o desenho experimental contemple as características ambientais e medidas que possam elucidar como os parâmetros de saúde são afetados.

Com base no referencial teórico supracitado acerca do tema EFA, saúde e poluição atmosférica; bem como os procedimentos metodológicos destacados dos estudos prévios, as hipóteses formuladas na presente tese de doutorado foram: quando comparado com exercício realizado no ambiente com ar filtrado (AmbFil), o EIAI realizado em ambiente com ar poluído (AmbPol) causará: i. maior estresse cardiovascular, ii. maior produção de citocinas pró-inflamatórias e menor produção de citocinas anti-inflamatórias, iii. alteração nas vias metabólicas associadas ao balanço energético e aos estresses oxidativo e cardiovascular.

2. OBJETIVO GERAL

Analisar o impacto do exercício intervalado de alta intensidade sobre as respostas cardiovasculares, perfil inflamatório e metabólica, quando realizado em ambiente com poluição atmosférica.

2.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos da presente tese de doutorado serão divididos em dois estudos, a saber:

Estudo 1. Analisar o impacto da prática de EIAI em ambiente com poluição atmosférica para:

- a. Estresse cardiovascular a partir da FC mensurada durante.
- b. Estresse cardiovascular a partir da PA após exercício.
- c. Perfil inflamatório a partir das citocinas IL-6, IL-10, Fator de Necrose Tumoral - alfa (TNF- α) e Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF).

Estudo 2. Determinar como a exposição ao ambiente com poluição atmosférica pode afetar as vias metabólicas após EIAI.

3. CAPÍTULO I. Revisão da Literatura

3.1. Poluição atmosférica

3.1.1. Uma breve retrospectiva de eventos que impulsionaram a pesquisa científica

Os avanços industriais observados ao longo da história são notórios e louváveis, em contrapartida, grandes problemas foram também associados a eles, com destaque para a exploração do meio ambiente. Por exemplo, iniciada em meados do século XVIII, a Revolução Industrial transformou o modo de produção, passando da característica artesanal para industrial (larga escala), especialmente pelo uso de máquinas à vapor, que tinham na combustão sua fonte energética (NRIAGU, 1996). De maneira concomitante houve maior concentração demográfica nos centros urbanos, ou seja, mais pessoas e mais poluentes concentrados em uma mesma localidade. Ainda como resultado da revolução industrial, houve exponencial aumento do número de veículos no século XIX, seus gases eram oriundos basicamente da combustão de petróleo. Curiosamente, nos dias atuais, os automóveis são considerados os principais emissores de poluentes nas grandes cidades (XIA et al., 2013b; ZHANG; BATTERMAN, 2013).

Outros incidentes contribuíram para alteração da qualidade do ar, como o desastre de dezembro de 1930 no vale Meuse (Bélgica). Essa região tinha acentuada atividade industrial e com a combinação de diversos poluentes e características geográficas da região, uma espessa camada de um nevoeiro tóxico cobriu o território; em três dias houve mais de 60 mortes, majoritariamente de idosos com doenças associadas aos sistemas respiratório e cardiovascular (NEMERY; HOET; NEMMAR, 2001). O evento do vale Meuse também causou preocupação à comunidade científica. Pouco depois desse ocorrido, um médico e pesquisador chamado Jean Firket (1890 – 1950) publicou um estudo demonstrando que, além das mortes, houve um número grande de pessoas afetadas cronicamente pelo desastre (FIRKET, 1936).

Ainda em meados do século XX, ocorreu em Donora (EUA, 1948) um nevoeiro tóxico cobriu a região, deixando os moradores com complicações à saúde e alguns mortos. O serviço de saúde pública dos Estados Unidos acentuou sua atividade para resolver os problemas causados pelo desastre. Alguns anos mais tarde, um episódio chamado de “*London Fog*” ocorreu na cidade de Londres (1952). Devido à maior produção de gases poluentes e condições climáticas um forte nevoeiro também tóxico cobriu a cidade, por aproximadamente cinco dias, causando mais de 4000 mortes (WILKINS, 1954).

Como esses eventos impulsionaram a pesquisa científica pode ser observado em uma busca à base de dados Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), com os termos “*air pollution*” e “*health*”. A figura 1 apresenta o número de trabalhos publicados a partir da década de 1940 (PUBMED, 2017). Na década de 1940 eram 9 trabalhos publicados, na década de 1950 esse número passou para 188. Na última década (até 2019), mais de 16 mil trabalhos foram publicados.

Figura 1 - Trabalhos publicados e indexados na base de dados *Pubmed* entre os anos 1940 - 2010.

Em resumo, três pontos em comum dos desastres ambientais citados até aqui podem ser destacados, como: i. atividade predatória e irresponsável da indústria, ii o fato de terem impulsionado o apelo para o controle da qualidade do ar e iii. aumento da produção científica nessa área, naturalmente, o foco inicial foi para parâmetros de saúde.

3.1.2. Poluição atmosférica e saúde

Como indicado no subcapítulo anterior as pesquisas científicas sobre poluição atmosférica e saúde foram impulsionadas por desastres ambientais. De fato, já foi reportado

que diante desses acontecimentos, há também maior interesse por parte da comunidade acadêmica (MATTEDI; BUTZKE, 2001). Assim, os estudos iniciais sobre poluição atmosférica e saúde buscaram estabelecer associação entre os fatos. Por exemplo, uma revisão publicada em 1955 descreveu que problemas associados ao sistema respiratório eram bem comuns em localidades com altos índices de poluição atmosférica (KOTIN; FALK, 1955). Os sintomas agudos mais reportados foram irritação do trato respiratório superior, dor no peito, dispneia e interferências nas funções respiratórias normais. No tocante às taxas de mortalidade, outro estudo demonstrou associação positiva para partículas suspensas ($r = 0,804$, $p < 0,05$) e sulfatos ($r = 0,813$, $p < 0,05$) (LAVE; SESKIN, 1970).

Sobre o sistema cardiovascular, um outro estudo reportou que os MPs estão associados as taxas de mortalidade por doenças cardiopulmonares (DOCKERY et al., 1993). Foi demonstrado que os poluentes causavam alterações na PA, com valores maiores após exposição (DOCKERY et al., 1993). Alguns fatores podem ser citados para explicar os valores superiores, como: i. aterosclerose e ii. alterações no controle autonômico do coração. Os mecanismos associados a aterosclerose, são o acúmulo de lipídios e placas fibrosas na parede arterial (que caracterizam a aterosclerose). Tem-se demonstrado que a exposição à alguns poluentes (especialmente o MP) potencializam esse quadro.

De fato, há uma cadeia de acontecimentos para que ocorra a aterosclerose, no qual a inalação de $MP_{2.5}$ gera um quadro de inflamação e estresse oxidativo. Esses dois pontos levam a lesão de células endoteliais e a criação do ateroma, a curto e longo prazos ocorre o aumento da PA (BAI; SUN, 2016). O segundo fator é que há receptores e terminações nervosas alinhados com as vias aéreas e, ao inalar altas concentrações de poluentes (mais uma vez, destacando o MP), ocorre uma alteração reflexa, inibindo o tônus parassimpático, reforçando a ação do tônus simpático, aumentando assim, a PA (BROOK et al., 2009). Especula-se também que existam receptores localizados nos pulmões, que induzem uma ação reflexa que causam desequilíbrio no controle autônomo do coração com acentuada ação simpática. Contudo, com o atual corpo de conhecimento disponível ainda não é possível afirmar se esse processo ocorre com humanos (GHELFI et al., 2008; JANGHORBANI; MOMENI; MANSOURIAN, 2014; NYHAN; MCNABOLA; MISSTEAR, 2014).

Os processos inflamatórios induzidos pela poluição atmosférica também levam ao aumento de internações hospitalares e doenças relacionadas ao sistema respiratório, como a asma (BERNSTEIN et al., 2004). E até mesmo o metabolismo pode ser afetado pela exposição aos poluentes. Nesse sentido, tem sido demonstrada a associação entre poluição atmosférica e diabetes (BUTALIA et al., 2016). Essa disfunção metabólica é causada por algumas ações do

organismo, como processo de inflamação sistêmica, estresse oxidativo e alta atividade de vias adrenérgicas (WOLF et al., 2016). Portanto, do ponto de vista metabólico, os resultados supracitados indicam também que é possível ter uma resposta sistêmica à poluição atmosférica.

Utilizando a técnica analítica metabolômica, foi demonstrado que o perfil metabolômico de ratos é alterado frente exposição ao O₃, causando alterações nos metabolismos de glicose, proteína e lipídios (MILLER et al., 2015). Os autores discutiram que esse perfil indicou, de maneira sistemática, diversas respostas do organismo nessas condições. Como acentuada ação inflamatória, estresse oxidativo e exacerbada ação de vias adrenérgicas que causam maior liberação de hormônios associados ao estresse. Resultados similares foram encontrados por Brower et al. (2016), por meio do perfil metabolômico de ratos expostos à emissão de um motor a combustão por diesel e gasolina. Foi maior concentração de metabólitos associados ao estresse oxidativo, inflamação, metabolismo de lipídios e via energéticas logo após e 18 horas após exposição. É importante destacar que no momento 18 horas após as diferenças foram menos pronunciadas.

Em síntese, está bem estabelecido que de maneira aguda altos índices de poluição atmosférica prejudicam a funcionalidade do sistema cardiovascular e também da atividade metabólica. De maneira crônica, podem levar a doenças como diabetes e hipertensão. Como uma das principais formas de contato com a poluição é pela via respiratória, é racional presumir que, se há maior VE há também maior quantidade de poluentes sendo inalados, e um meio clássico para aumento da VE é o EFA.

3.1.3. Exercício físico aeróbio em ambientes poluídos

A prática regular de EFA tem sido amplamente incentivada para promoção da saúde, qualidade de vida e também para desempenho (CORNELISSEN et al., 2010; LAURSEN, 2010). Tal como os efeitos positivos em ser fisicamente ativo, há um vasto número de estudos que demonstram também que o sedentarismo é criticamente prejudicial à saúde. Nesse contexto, é possível indicar um certo dilema sobre ser sedentário ou fisicamente ativo em ambientes urbanos com elevado nível de poluentes. Durante o exercício alguns aspectos da mecânica da VE influenciam os mecanismos de proteção do corpo contra os poluentes, a saber: i. predominância da respiração oral, ii. maiores frequência e profundidade respiratórias, iii. dilatação dos brônquios, iv. diminuição da temperatura do ar ventilado, assim, maior ressecamento das mucosas nasal e da traqueia (GILES; KOEHLE, 2014; GIORGINI et al., 2016).

Nesse sentido, a escolha do ambiente para a prática de exercícios físicos é importante para evitar ou diminuir exposição à altas concentrações de poluição atmosférica. Por exemplo, já foi demonstrado que em jogadores de *hockey* sobre o gelo ocorre pior desempenho em testes funcionais do pulmão (comparando início e o fim da temporada), conjuntamente pela baixa temperatura ar e altas concentrações de gases tóxicos, como CO e dióxido sulfúrico (SO₂) (GAME; BELL, 2006). Notadamente, o *hockey* no gelo é uma prática esportiva distante da realidade brasileira. Porém, um recente estudo conduzido por Žitnik et al. (2016) demonstrou que até mesmo para práticas esportivas em ambientes fechados (como em academias de ginástica e ginásios) têm altos índices de poluição atmosférica, porque há aumento da temperatura local, agregado à ressuspensão de material particulado e má ventilação de ambientes fechados.

Os EFA e o transporte ativo são comumente praticados em ambientes abertos. E para o transporte ativo, é geralmente realizado próximo às vias com tráfego intenso de automóveis. Em um estudo conduzido por Cozza et al. (2015), verificou-se que na cidade de São Paulo, os indivíduos que usam os transportes público e ativo para chegarem ao seu destino (escola, trabalho, entretenimento) percorrem diariamente de 2 a 4 km. Considerando a intensidade de deslocamento, Giles e Koehle (2014) apresentaram que nessa intensidade, a VE chega a ser 3 a 4,5 vezes maior do que os valores de repouso. Nesse aspecto, um ponto crucial para estudos com EFA e poluição atmosférica pode ser destacado, há um limiar de transição em que a respiração passa a ser predominantemente oral (NIINIMAA et al., 1980), o que ocorre aproximadamente com uma taxa de VE igual a 35,4 (L·min⁻¹).

Como já descrito, durante o transporte ativo a VE pode ser 3 – 4,5 vezes maior do que em repouso. Assim, é fácil estimar que se durante o repouso¹, a VE é de aproximadamente 8,65 (L·min⁻¹), com o transporte ativo ela passa a ter valores iguais a 25,95 – 38,92 (L·min⁻¹), ou seja, o primeiro mecanismo de defesa do organismo (respiração predominantemente nasal) é superado. E apesar do aumento da VE proporcionar maior quantidade dos poluentes inalados, paradoxalmente, alguns estudos apontam que o transporte ativo é uma boa alternativa para atenuar os efeitos deletérios da poluição atmosférica.

Em um estudo conduzido por Rojas-Rueda et al. (2016) foi demonstrado que políticas públicas voltadas para fomentar o uso do transporte ativo (para pedestres e ciclistas) poderiam diminuir consideravelmente o índice de mortes anuais causadas pela poluição atmosférica, se o

¹ Utilizando os dados da VE do momento pré (repouso) do presente estudo.

número de pedestres (como em Copenhague) e ciclistas (como em Paris) fossem aumentados em 35 e 50%, respectivamente. Os autores justificaram que essas ações diminuiriam a emissão de poluentes por autos e também promoveriam os benefícios da prática regular de EFA. Entretanto, há um certo ponto em que o deslocamento por transporte ativo se torna prejudicial. De acordo com os achados de Tainio et al. (2016) a partir de 5 horas de exposição diária à elevadas concentrações de poluentes, os efeitos benéficos do exercício são suprimidos pelos efeitos negativos causados à saúde pela poluição.

Se durante o transporte ativo a VE é aumentada em comparação ao repouso, durante o EFA esse efeito é potencializado. De fato, ao longo dos últimos 60 anos estudos foram conduzidos com o intuito de descrever como é a interação do organismo e a poluição atmosférica durante o EFA. Por exemplo, Stokinger; Wagner e Wright (1956) descreveram, com modelo animal que, ratos e camundongos que se exercitaram em uma câmara com 1 ppm O_3 tiveram pouco mais de 50% de mortalidade dentro de seis horas após exposição, enquanto os animais que apenas ficavam em repouso e expostos à mesma dosagem por 200 dias não apresentaram efeitos sérios. Smith (1965) demonstrou que a exposição de humanos à uma fumaça fotoquímica (peróxido de acetil nitrato (PAN)) durante o exercício submáximo gera diferenças no VO_2 pré, durante e após exercício. Também se observou um aumento na FC de repouso, indicando assim, maior estresse cardiovascular em ambiente poluído com PAN.

Em outro estudo com humanos, Holland et al. (1968) testaram os efeitos da exposição à poluição atmosférica sobre o VO_2 e FC. Os resultados indicaram que não houve alteração para esses parâmetros fisiológicos. Drinkwater et al. (1974) realizaram um estudo com o intuito de descrever em quais condições o VO_{2max} seria mais prejudicado. Os ambientes escolhidos foram: limpo, i. 50 ppm de CO; ii. 0,27 ppm de PAN e por fim, iii. um ambiente com combinação de CO e PAN. Os valores de VO_{2max} foram os mesmos em todas as condições, contudo, no ambiente com CO o tempo de exercício foi menor. Esse resultado também foi encontrado por outros autores, com relação ao CO e diversas tarefas, como, trabalho total até exaustão (EKBLOM, 1972; PIRNAY et al., 1971; SEPPÄNEN, 1977).

Em outro estudo dessa natureza, Avol et al. (1984) investigaram o efeito da exposição a diferentes concentrações de O_3 em 50 sujeitos com idade igual a 26,4 anos, em intensidade de exercício de aproximadamente 150 bpm (FC). O resultado foi que a função pulmonar em concentrações maiores de O_3 foi diminuída. Acredita-se que a alta afinidade da hemoglobina com o CO (240 vezes maior do que com O_2) não somente reduz a disponibilidade de O_2 , mas também inibe a dissociação do mesmo, como destacado na revisão de Horvath (1980). Além dos estudos sobre como a poluição poderia impactar a saúde durante o exercício, ao final dos

anos 1960 houve interesse sobre a relação dessas variáveis com o desempenho em eventos de longa duração.

Assim, Wayne, Wehrle e Carroll (1967) descreveram uma associação positiva entre a queda do desempenho em corrida (prova de *cross-country* de 2 km) e as altas concentrações de partículas suspensas e durante as prova ($r = 0,762$; $p < 0,05$). Até o início da década de 1980, estudos já tinham demonstrado a prática de EFA em ambientes com distintas concentrações de poluentes impactavam negativamente a saúde. Naturalmente, é razoável pressupor que atletas de nível olímpico também poderiam ter o desempenho diminuído em virtude das altas concentrações de poluentes. Nesse sentido, foram realizadas duas revisões com esse tema, tendo como destaque as altas concentrações dos gases óxido sulfúrico (SO_3) e O_3 e sua combinação com exercício. O autores concluíram que em ambientes poluídos com esses gases há forte bronquiconstrição e diminuição do fluxo ventilatório, o que poderia diminuir o desempenho em eventos tipicamente aeróbios (PIERSON, 1989; PIERSON et al., 1986).

Conjuntamente os estudos realizados nas décadas de 60 até 90 objetivaram analisar os efeitos do EFA em ambiente poluído; e estabeleceram que a poluição pode causar: i. elevada taxa de mortalidade em animais que fizeram exercícios nesse ambiente, ii. afeta parâmetros cardiovasculares em humanos durante testes submáximos e máximos, iii. está associada a queda do desempenho em provas de longa duração e duração total em testes de carga constante, e por fim, d. afeta inclusive parâmetros perceptivos da intensidade de esforço. Esses achados foram importantes para a concretização de uma área fértil e necessária para pesquisa, e a partir deles, os estudos puderam também aprimorar sua proposta metodológica.

Além do foco de pesquisa ser os efeitos da poluição atmosférica sobre o EFA. Assim, em um trabalho conduzido por Giles; Carlsten e Koehle (2012), os voluntários ficaram uma hora em exposição prévia ao ar limpo e em outra oportunidade ao ar poluído (combustão de motor a diesel). Em seguida eles realizaram um teste contrarrelógio de 20 km em cicloergômetro. O desempenho não foi alterado, em contrapartida, os valores de FC foram significativamente menores (~ 6 bpm) após exposição ao ambiente com ar limpo ($p = 0,023$). Os autores propuseram que a exposição ao material particulado inibiu o sistema nervoso parassimpático, assim, a maior ação simpática ocasionou o aumento da FC durante o teste em ambiente poluído. Este resultado também foi encontrado após teste progressivo de corrida até exaustão, sendo que, em ambiente poluído a FC foi $\sim 8\%$ maior do que no outro ambiente (KARGARFARD et al. 2015).

De fato, algumas revisões recentes sobre poluição atmosférica e EFA, têm indicado que variáveis cardiovasculares, como a PA, podem representar o estresse cardiovascular quando há

prática de exercícios em ambientes poluídos. Giles e Koehle (2014) descreveram que os efeitos positivos do exercício, como a hipotensão após exercício causada pela vasodilatação periférica pode ser suprimida por alguns poluentes, especialmente o MP. Essas informações foram corroboradas pela revisão de Giorgini et al. (2016), indicando que o MP causa disfunção vascular e não favorece o balanço autonômico cardiovascular, caracterizado por acentuada ação simpática. É interessante enfatizar que os parâmetros cardiovasculares, como FC e PA estão relacionados também com o metabolismo durante o exercício. Contudo, poucas investigações científicas consideraram os efeitos da prática de exercícios nesses ambientes, bem como seu potencial mecanismo.

Nesse sentido, um estudo recente com jovens adultos e saudáveis foi conduzido por Miller et al. (2016). Por meio da técnica metabolômica, os autores demonstraram que o metabolismo de lipídios era alterado quando o EFA de baixa intensidade foi realizado em exposição ao O₃, e ainda, houve acentuada produção de corpos cetônicos. Os autores discutiram que esse achado se deve ao maior estresse oxidativo e concomitantes alterações no metabolismo de lipídios e corpos cetônicos. E tem sido demonstrado que algumas condições favorecem a produção de corpos cetônicos, como: i. restrição de alimentos, ii. doenças relacionadas ao metabolismo e iii. disfunção energética (COX; CLARKE, 2014). A abordagem analítica utilizada nesse estudo foi robusta o suficiente para testar sua construção teórica e pergunta de pesquisa; mesmo assim, é possível que alguns pontos sejam aprimorados.

Por exemplo, o protocolo de exercício pode ter maior proximidade com a realidade do praticante de EFA (maior validade ecológica). Os voluntários realizaram exercício aeróbico de baixa intensidade (VE de $\sim 25 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) em ciclo ergômetro, sendo que, o tempo total foi de 120 min, porém com 15 min de exercício e 15 min de repouso. Adicionalmente, é preciso considerar a exposição ao poluente. De fato, o uso de câmaras para exposição é atraente pelo forte controle de outras variáveis; como vento, temperatura e umidade do ar. Entretanto, as câmaras não conseguem representar a poluição presente nos grandes centros urbanos.

Diante do impasse acerca da abordagem metodológica para estudos com poluição atmosférica e exercício, Bos et al. (2013) conduziram um estudo com dois grupos em localidades distintas, um grupo treinou em um centro urbano e o outro na zona rural, com altas e baixas concentrações de poluentes, respectivamente. O treinamento durou 3 meses, sendo realizado 3 vezes por semana nesse período. No início, as atividades eram compostas por caminhada e corrida, o volume e intensidade foram aumentados progressivamente, para que ao final as atividades fossem compostas apenas por corridas. O estudo indicou que os dois grupos aumentaram a distância percorrida em um teste de 12 min. Contudo, os indivíduos que

treinaram em ambiente com altos índices de poluição apresentaram acentuada ação de marcadores de inflamação (contagem de leucócitos e neutrófilos)

Do nosso conhecimento, o estudo conduzido Bos et al. (2013) foi pioneiro ao tentar demonstrar como o treinamento em um ambiente poluído pode não ser tão benéfico para saúde. Apesar da atraente ideia, é preciso indicar que as medidas relacionadas ao desempenho e inflamação sistêmica foram feitas nos momentos pré e após treinamento, nesse sentido, não necessariamente o quadro de inflamação sinaliza uma resposta crônica do organismo ao treinamento, e sim uma resposta aguda ao EFA realizado em ambiente poluído. De fato, estudos anteriores já demonstraram que há um quadro de inflamação sistêmica após exposição à AP (BERNSTEIN et al., 2004) e esse quadro é potencializado quando EFA é realizado (BOS et al., 2014). Outra questão metodológica foi ter que considerar dois grupos de pessoas distintas, assim, a variação fisiológica entre os participantes foi maior do que em um estudo com medidas repetidas (mesmas pessoas em condições distintas).

Portanto, conduzir estudos de longa duração sobre o treinamento aeróbico e poluição atmosférica tem sido um grande desafio para a área. Mesmo assim, estudos com modelo animal tentaram demonstrar como o treinamento aeróbico pode mitigar os efeitos negativos da poluição atmosférica. Por exemplo, foi demonstrado com camundongos que o exercício aeróbico a longo prazo teve ação anti-inflamatória, inibindo indicadores de inflamação sistêmica (DE PAULA VIEIRA et al., 2012). Além disso, em outro estudo foi demonstrado que o exercício tem efeito positivo para controlar o estresse oxidativo causado pela poluição (TOLEDO et al., 2012). Assim, do ponto de vista das adaptações crônicas, há indícios científicos de que os benefícios causados pela prática de exercícios físicos podem atenuar os efeitos nocivos da poluição atmosférica sobre o organismo.

Em síntese, com o corpo de conhecimento disponível atualmente acerca da prática EFA em AP é possível indicar que de modo agudo, há aumento do estresse cardiovascular e maior estresse metabólico. Inclusive, essa interação de fatores pode também impactar negativamente o desempenho. Em comum, os trabalhos citados nesse capítulo indicam a necessidade de mais estudos para entender como o organismo reage frente ao exercício em ambientes com índices elevados de poluição atmosférica. Como principais limitações dos estudos acerca do tema, há a necessidade de se ter maior e melhor controle dos exercícios físicos, especialmente intensidades e características. Bem como a abordagem metodológica para exposição aos poluentes (câmaras de exposição vs ar das grandes cidades).

3.2. Exercício aeróbio intervalado

3.2.1. Do empirismo aos avanços científicos do treinamento esportivo

Os exercícios de alta intensidade, intercalados por pausas ou recuperação ativa receberam o nome de intervalado. No início do século XX, atletas corredores de longas distâncias, modalidades tipicamente aeróbias, utilizaram esse método de corrida de modo empírico, (BILLAT, 2001; BUCHHEIT; LAURSEN, 2013a). Um importante personagem desse período é o atleta, treinador e cientista do esporte Lauri Pihkala (1888 – 1981), que ainda nas primeiras décadas do século XX escreveu os primeiros textos com descrições e ideias sobre o treinamento intervalado. Ele orientou alguns dos atletas mais importantes da história da corrida de longa duração, Hannes Kolhmainen² e Paavo Nurmi³, também conhecidos como “Finlandeses Voadores⁴” (VETTENNIEMI, 2012). Alguns anos depois (~anos 40) o suéco Gunder Hägg⁵ também utilizou o treinamento intervalado, contudo aplicando o método em distintos terrenos, correndo em subidas, descidas e florestas (BILLAT, 2001).

Apesar de um histórico prévio nas sessões de treinamento de corredores, a grande difusão do método intervalado ocorreu por volta dos anos 50, graças ao corredor tcheco Emil Zatopek⁶. Acredita-se que Zatopek seja o pioneiro na proposta de um método que alternava arbitrariamente a velocidade durante a corrida, o método *Fartlek*. Com corridas contínuas de duração de uma até duas horas, composto por períodos de maior e menor velocidades. Adicionalmente, ele também passou a utilizar o treinamento intervalado em distâncias menores e, portanto, em maior intensidade (LUCAS, 1977).

Concomitante ao avanço dos métodos de treinamento surgiam os estudos pioneiros na área de fisiologia do exercício. Sendo que, os pesquisadores envolvidos sempre estiveram interligados por trabalhos conduzidos em parceria, por utilizarem os mesmos laboratórios ou até mesmo por terem dado seguimento a linhas de pesquisa estabelecidas previamente. Por exemplo, as primeiras ideias sobre as alterações ocorridas na VE, FC, débito cardíaco foram conduzidas pelos pesquisadores dinamarqueses Johannes Lindhard (1870 – 1947) e August Krogh (1874 – 1949), esse último, vencedor do prêmio Nobel de fisiologia no ano de 1920.

² Ouro nas provas de 5, 10 e 12 km em Estocolmo, 1912 e maratona em Antuérpia, 1920.

³ 9 medalhas olímpicas entre 1920 e 1928.

⁴ Grupo de corredores que dominaram as corridas de longa duração no início do século XX. Outros corredores também receberam esse nome, contudo, nesse texto destacou-se dois dos mais famosos e que receberam orientações de Lauri Pihkala.

⁵ Estipulou 15 recordes em eventos de média e longa duração.

⁶ Ouro nas provas de 5 km, 10 km e maratona nos jogos olímpicos de Helsinque, 1952.

Lindhard e Krogh também foram importantes para a formação de novos pesquisadores, como o sueco Erik Hohwu-Christensen (1904 – 1996). As teorias postuladas pelos dois permitiram um avanço significativo na área de fisiologia do exercício (especialmente relacionadas a VE). Talvez, o avanço mais importante foi apresentado pelas pesquisas de Archibald Vivian Hill (1886 – 1977) e Otto Fritz Meyerhof (1884 – 1951), vencedores do Prêmio Nobel de Fisiologia (1922). Eles postularam teorias que sustentam a fisiologia do exercício até os dias atuais, especialmente sobre metabolismo (produção de lactato pelo músculo esquelético) e parâmetros associados à respiração (VE e VO₂),

Interessantemente, os avanços na metodologia do treinamento aeróbio e também da fisiologia do exercício nas primeiras décadas do século XX se encontraram em pesquisas lideradas por Erik Hohwu-Christensen e Per-Olof Åstrand (1922 – 2015)⁷, nos anos 50 e 60. Os dois pesquisadores ajudaram a entender os mecanismos fisiológicos envolvidos no exercício intervalado. Apesar dos estudos conduzidos pelos pesquisadores citados até aqui, o termo “Treinamento Intervalado” foi proposto pela primeira vez por Reindell e Roskamm, em 1959. Além disso, a esses pesquisadores alemães é creditada a aproximação entre treinadores, atletas e cientistas do esporte para ajustes na prescrição, treinamento e avanços científicos do mesmo (SEILER; TØNNESSEN, 2009; SVENSSON, 2016). É importante destacar que atualmente os exercícios intervalados são amplamente estudados pela comunidade científica (BILLAT, 2001; BUCHHEIT; LAURSEN, 2013b, 2013a; GIBALA; MCGEE, 2008).

Sumarizando as ideias expostas nesse tópico, é possível perceber que os avanços do treinamento esportivo, especialmente dos métodos de treinamento intervalado, tiveram grande aparato empírico. Concomitantemente, houve o avanço de uma área importante da educação física e esporte, a fisiologia do exercício. Graças ao avanço das duas e também, sua união, pôde-se aprimorar o entendimento de mecanismos relacionados ao treinamento aeróbio intervalado. Atualmente, esse método não é aplicado exclusivamente ao treinamento de alto rendimento, mas também atletas recreacionais, atividade física e saúde.

⁷ Aqui vale dedicar um espaço para um importante fato do nosso grupo de pesquisa. A título de curiosidade, o grupo, quando liderado pela Professora Dra. Maria Augusta Kiss, recebeu a visita do Professor Åstrand no fim dos anos 90. Os alunos que receberam o visitante foram os Professores Doutores Jorge Perrou e Fernando de-Oliveira (membro do Grupo de Estudos do Desempenho Aeróbio – GEDAE), na oportunidade eles apresentaram e discutiram os temas de pesquisa nos estudos que conduziam, sobre adaptações cardiovasculares ao exercício físico.

3.2.2. Aplicações práticas para o desempenho esportivo, atividade física e saúde

O desempenho tem um papel importante em estudos com EIAI, em especial porque inicialmente ele foi utilizado por corredores de elevado nível competitivo. Alguns estudos têm demonstrado que essa estratégia de exercício pode otimizar variáveis importantes do metabolismo aeróbio e, portanto, o desempenho também é aumentado. Algumas revisões têm demonstrado que o desempenho em provas de longa duração (predominantemente aeróbias) estão associadas as variáveis como $VO_2\text{max}$, economia de corrida, pico de velocidade atingido em teste incremental máximo (TIM), e essas variáveis podem ser influenciadas pelas características do treinamento, em especial, o intervalado (BUCHHEIT; LAURSEN, 2013a; MILANOVIĆ; SPORIŠ; WESTON, 2015; SEILER; TØNNESEN, 2009; WESTON et al., 2014).

Os mecanismos envolvidos nesses resultados vão de adaptações neuromusculares, (porque há maior recrutamento de unidades motoras) até fisiológicas. Nesse sentido, Billat (2001) descreveu que, por permitir períodos de recuperação, ao final de cada série de exercícios é possível ter permanecido longos períodos em intensidade próximas, iguais ou as vezes superior à do $VO_2\text{max}$, potencializando as adaptações positivas. Adicionalmente, há maior densidade mitocondrial, que implica diretamente com a capacidade de remover metabólitos (recuperação) oriundos do metabolismo glicolítico até ao aumento da aptidão aeróbia (BILLAT, 2001; BUCHHEIT; LAURSEN, 2013a). Há também alterações nos limiares ventilatórios e de lactato (LAURSEN, 2010).

Outra importante variável para o desempenho aeróbio é a economia de corrida, que também pode ser alterada após período de treinamento intervalado, isto ocorre por alguns fatores, mas do ponto de vista metabólico, acredita-se que a maior ação de enzimas associadas aos metabolismos glicolítico (e. g. piruvato desidrogenase) e aeróbio (e. g. citrato sintase) promovem a adaptação metabólica (GIBALA et al., 2012; GIBALA; MCGEE, 2008). Adicionalmente, é sugerido também que adaptações cardiovasculares promovam a melhora do $VO_2\text{max}$, pois há aumento do volume máximo de ejeção, e portanto, aumento do débito cardíaco máximo (BUCHHEIT; LAURSEN, 2013a).

É interessante destacar que devido à melhora do $VO_2\text{max}$ e da economia de corrida, o pico de velocidade atingido após período de treinamento baseado em EIAI pode ser maior. E ainda, variáveis do sistema cardiovascular e neuromusculares têm adaptação positiva. Do ponto de vista do desempenho, conjuntamente, essas variáveis foram responsáveis, por exemplo, pela diminuição no tempo total para corredores percorrem 3 km (SMITH; COOMBES; GERAGHTY, 2003; SMITH; MCNAUGHTON; MARSHALL, 1999). Se sobre o desempenho

e EIAI há um vasto corpo de conhecimento, recentemente é possível destacar também o aumento da demanda de exercícios com essas características para promoção da saúde.

Para sujeitos fisicamente ativos e sedentários, o EIAI tem sido utilizado como ferramenta para promoção e manutenção de aspectos relacionados a saúde (WESTON et al., 2014). Em um estudo recente foi demonstrado que, para mulheres com obesidade ou sobrepeso, o EIAI causa diminuição da gordura corporal, devido ao aumento do gasto energético e também alteração na taxa metabólica (SMITH-RYAN et al., 2016). Apesar de ainda inconclusivo nessa área, até mesmo para sujeitos com problemas cardiovasculares (insuficiência cardíaca e doença arterial coronariana) tem sido indicado exercícios com essas características (GUIRAUD et al., 2012). Aparentemente, as altas intensidades geram adaptações mais positivas aos pacientes (e.g. melhor regulação autonômica) quando comparados aos exercícios de intensidade inferior e os riscos são baixos se houver um controle preciso das variáveis hemodinâmicas (PA e FC).

As vantagens do EIAI, além do que já foi citado, é a dedicação (tempo total) por sessão de treinamento, que é reduzida. As sessões de exercícios podem ter duração mais curta e resultados iguais ou melhores para desempenho e saúde. Em contrapartida, alguns autores têm demonstrado também as limitações desse método. Buchheit e Laursen (2013b) demonstraram que é necessária uma adaptação ao método de treinamento, um processo individual e variável com relação ao número de sessões e sua respectiva duração. Outra condição que pode ser nociva ao desempenho e saúde dos praticantes é o risco de más adaptações do organismo frente a magnitude do estresse causado pelo EIAI. Por exemplo, já foi demonstrado com corredores, que após período de sobrecarga de treinamento, baseado em exercício intervalado na intensidade do VO_2max , houve aumento das concentrações de noradrenalina, indicando uma possível má adaptação ao treinamento (BILLAT et al., 1999).

Em síntese, é possível apresentar que o EIAI tem sido amplamente utilizado para estudos com interesse no desempenho de modalidades tipicamente aeróbias até para as pesquisas relacionadas à atividade física e saúde. As adaptações causadas por exercícios com essas características são sistêmicas e podem englobar medidas fisiológicas, metabólicas e neuromusculares. Apesar de atrativo, alguns cuidados precisam ser considerados, especialmente com relação às possíveis má adaptações ao treinamento, e para populações especiais o acompanhamento e controle de variáveis relacionadas à saúde cardiovascular. Um ponto inevitável dos estudos que consideram exercícios intervalados é a comparação com outro tipo de exercício, o contínuo, porém com menor intensidade.

3.2.3. Comparação com exercício contínuo

Os estudos que consideraram o exercício intervalado em seu protocolo experimental, de modo geral, também incluíram o exercício contínuo, com o intuito de comparar as respostas fisiológicas agudas e crônicas desses dois tipos de exercício (BUCHHEIT; LAURSEN, 2013a; GIBALA et al., 2012). Contudo, dois estudos de revisão já reportaram que após período de treinamento baseado em EIAI e também ECBI, para sujeitos fisicamente ativos, é possível observar resultados similares. Por exemplo, aumento do VO_{2max} e também o desempenho em testes de carga constante até exaustão e testes contrarrelógio (LAURSEN; JENKINS, 2002). Considerando indivíduos treinados, Seiler e Tønnessen (2009) recomendam um programa de treinamento que contemple os dois tipos de exercício, pois as adaptações causadas pelos exercícios intervalados e contínuos são complementares.

Os mecanismos do exercício contínuo que geram adaptações positivas ao organismo, estão relacionados com a tensão entre encurtamento e alongamento muscular, o aumento de espécies reativas de oxigênio por vias predominantemente aeróbias, aumento da concentração de cálcio muscular e alteração dos estoques de substratos energéticos no músculo estimulam a capacidade de oxidação de lipídios, maior recrutamento de fibras do tipo I, maior atividade mitocondrial e também maior ação do transportador de glicose (Glut-4) (LAURSEN, 2010). Contudo, é preciso salientar que os resultados benéficos causados por esse método requerem atividades de longa duração. Porém, para comparar os resultados dos dois tipos de exercícios, os protocolos de investigação precisam equalizar alguma variável, sendo geralmente considerada a distância percorrida, trabalho total gerado ou gasto energético. É importante destacar que devido à baixa intensidade, os exercícios contínuos podem ter longa duração.

Resumindo, foi demonstrado que os dois tipos de exercícios promovem adaptações positivas ao organismo e também desempenho. Além disso, os estudos que comparam o exercício intervalado e o contínuo precisam equalizar alguma variável (distância percorrida, trabalho total) para proceder com as análises/comparações. Contudo, é bom destacar que os ECBI permitem um período de execução maior do que os EIAI, ou seja, o ECBI poderia durar mais tempo, o que, talvez, limite os possíveis benefícios gerados pelos exercícios contínuos.

3.3. Metabolômica

3.3.1. Do empirismo às modernas técnicas analíticas

A ideia de se obter a partir de uma única amostra informações sistêmicas de determinado fluido biológico datam de aproximadamente mais de meio século. Por exemplo, em um livro

texto de medicina, de Ullrich Pinder (1489-1509), no ano de 1506 já era descrito que a partir do sabor, coloração e cheiro da urina, era possível obter informações diagnósticas sobre algumas doenças (NICHOLSON; WILSON, 2003). Naturalmente com avanço científico de diversas áreas, houve também avanços de equipamentos mais robustos, que permitiram analisar os compostos biológicos.

Com auxílio da espectroscopia (interação da luz, radiação eletromagnética e composto biológico), fluidos biológicos podem fornecer informações sistêmicas do organismo. Nesse sentido, a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que é baseada na espectroscopia, foi utilizada com uma abordagem metabolômica (apesar de na oportunidade esse termo ainda não ser utilizado). Em um estudo pioneiro realizado em 1983, foi demonstrado que é possível discriminar alguns metabólitos a partir de amostras biológicas via análise de RMN (NICHOLSON; BUCKINGHAM; SADLER, 1983).

Outros marcos importantes para as pesquisas com metabolômica ocorreram, sem necessariamente utilizarem a técnica de análise baseada em RMN. Por exemplo, utilizando técnicas de separação hifenadas, no ano de 1971 um grupo de pesquisadores liderados pelo químico Linus Pauling⁸ (1901 – 1994), publicou o primeiro estudo com grande número de informações metabólicas a respeito do complexo sistema biológico humano. A partir dessa abordagem, os autores conseguiram discriminar substâncias compostas em amostras de urina de humanos (D’ALESSANDRO et al., 2012).

Uma outra técnica analítica denominada Espectrometria de Massas (EM) também é amplamente utilizada. Para essa análise, compostos são ionizados e separados de acordo com suas razões massa/carga, então suas intensidades são mensuradas em relação à abundância de cada íon (HOFFMANN; STROOBANT, 2007). Comparativamente há vantagens e desvantagens entre as técnicas espectroscópica de RMN e a espectrométrica (EMWAS, 2015; PAN; RAFTERY, 2007). A tabela 1 apresenta algumas comparações entre elas.

⁸ Linus Pauling. Nobel de Química em 1954 e Paz em 1966

Tabela 1 - Comparação entre as técnicas analíticas.

	RMN	EM
Preparação da amostra e identificação dos metabólitos	Exige preparação menor, todos os metabólitos podem ser identificados com uma análise.	Geralmente, exige técnicas de cromatografia para separação de amostras, dependendo dos metabólitos a serem identificados e quantificados.
Sensibilidade	De 20 a 200 metabólitos, dependendo da resolução espectral.	Até mais de 500 metabólitos.
Reprodutibilidade	Muito alta.	Moderada.
Tempo de análise	Maior.	Menor.
Recuperação da amostra	É possível recuperar a amostra para mais análises (também pode ficar armazenada por mais tempo).	Técnica destrutiva da amostra.

RMN. Ressonância magnética nuclear. EM. Espectrometria de massas.

Em síntese, desde a idade média há a tentativa de obter informações sistêmicas do organismo. A partir da evolução de equipamentos e técnicas analíticas avançadas, como RMN, as análises de metabolômica foram possíveis. De fato, até mesmo para pesquisas com exercícios físicos a técnica se mostrou atraente e ampla de possibilidades para o entendimento das respostas metabólicas ao exercício (NIEMAN et al., 2012, 2014, 2015; PEAKE et al., 2014).

3.3.2. Uma abordagem metabolômica para o exercício físico

A análise metabólica de alguns marcadores específicos é tradicionalmente usada para pesquisas e intervenções práticas em educação física e esporte, especialmente metabólitos que estão bem estabelecidos nessa área, como o ácido láctico ($C_3H_6O_3$). O ácido láctico foi descrito inicialmente pelo químico Carl Wilhelm Scheele (1742 – 1786), que descobriu a presença desse ácido no leite, no ano de 1780. Em 1922, os vencedores do Nobel de Fisiologia Otto Fritz Meyerhof (1884 – 1951) e Archibald Vivian Hill (1886 – 1977) descreveram o metabolismo muscular e postularam que durante a contração muscular havia produção de lactato (ROBERGS; GHASVAND; PARKER, 2004). Talvez, historicamente, o metabólito mais

avaliado em pesquisas da educação física e esporte seja o lactato, devido à sua associação direta com os processos metabólicos do exercício.

Não obstante, é inegável que técnicas mais robustas que possam avaliar de maneira sistêmica como uma grande quantidade de metabólitos podem ser expressas, são mais atrativas. Assim, estudos recentes têm utilizado a metabolômica para descrever o perfil metabólico. Inicialmente, houve maior demanda para estudos que procuravam descrever alterações metabólicas com populações em condições especiais, relacionadas à diversas doenças, por exemplo, pacientes com isquemia miocárdica (SABATINE et al., 2005), câncer (HURSTING et al., 2007) e disfunções metabólicas (MUOIO; KOVES, 2008). As pesquisas que envolveram exclusivamente o perfil metabolômico e exercício foram conduzidas pouco tempo depois.

Em estudo pioneiro com remadores bem treinados, foi demonstrado que o perfil metabolômico dos atletas da categoria sênior (23 anos) era distinto dos atletas da categoria mais nova (20 anos) e ambos eram diferentes do grupo controle, composto por sujeitos sedentários (YAN et al., 2009), assim, mesmo com grupos mais homogêneos (idades e níveis de treinamento próximos) foi possível detectar diferenças.

Especificamente para atividades predominantemente aeróbias, foi demonstrado por um grupo de pesquisadores liderados por David Nieman 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 hora após para os ciclistas; imediatamente e 14 horas após para os corredores (NIEMAN et al., 2013, 2014). Nos dois estudos os autores discutiram que o transporte e oxidação de ácidos graxos através da membrana mitocondrial são mais pronunciados após exercício aeróbio extenuante.

Considerando ciclistas altamente treinados, o perfil metabolômico dos atletas foi comparado após EIAI e ECBI. Os resultados indicaram que durante o EIAI as vias relacionadas ao metabolismo glicolítico são mais acentuadas, em contrapartida para o ECBI há maior predominância de vias lipídicas (PEAKE et al., 2014), naturalmente a intensidade discrepante das duas tarefas causou perfis distintos no metaboloma após exercício.

Em outra investigação que utilizou essa técnica, um grupo de maratonistas foi estratificado pelo desempenho, e houve diferença no perfil metabolômico dos sujeitos com maior e menor tempo total na prova, mais uma vez, destacando a sensibilidade da técnica (LEWIS et al., 2010). Adicionalmente, há uma mensagem importante que pode ser obtida a partir dos resultados desse estudo, os EFA têm algumas vias metabólicas mais acentuadas,

como as vias glicolítica e lipídica, e ainda, metabólitos que representam estresse oxidativo e inflamação, processos catabólicos de amino ácidos e produção de corpos cetônicos.

Por fim, um estudo que objetivou descrever o perfil metabolômico após EFA, o protocolo experimental utilizado foi um TIM em ciclo ergômetro para determinação do VO_2max e depois, procedeu-se com 45 min de exercício submáximo (50% da potência máxima atingida no TIM). Os resultados obtidos demonstraram que o exercício (intensidade 156 ± 14 bpm) foi capaz de alterar o perfil metabolômico dos sujeitos (comparando repouso vs exercício). As vias metabólicas alteradas foram dos metabolismos de purina, glicolítico e lipídios (MUHSEN ALI et al., 2016). Os autores discutiram que: o metabolismo de Purina parece ser um indicativo de exercícios físicos, por isso no momento após exercício os metabólitos dessa via tinham concentrações superiores; os metabolismos glicolítico e de lipídios foram acentuados devido a demanda energética da atividade.

O uso da metabolômica em estudos que envolvem exercícios é relativamente recente. Em conjunto esses estudos fornecem indícios sólidos que o perfil metabolômico pode ser alterado até mesmo para grupos mais homogêneos, tal como distintos perfis relacionados ao gênero, idade e até mesmo estado de treinamento. Adicionalmente, há indícios fortes que ele também seja tarefa dependente. Portanto, a sensibilidade da metabolômica pode discriminar até mesmo exercícios que estão em faixas de intensidade ou duração mais próximos. Apesar das vantagens claras dessa técnica, é preciso também indicar alguns pontos limitantes. Devido ao alto custo, o acesso aos equipamentos necessários para análises pode ser menor. Adicionalmente, é necessário também técnicos treinados para condução das análises, que vão desde a coleta do sangue venoso à obtenção dos espectros e quantificação dos metabólitos (mais informações Anexo II).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos metodológicos que são comuns aos estudos dos capítulos 2 e 3 serão apresentados nos tópicos a seguir. Os procedimentos específicos serão apresentados nas seções “Materiais e Métodos” de cada um dos estudos.

4.1. Poluentes atmosféricos e o contêiner de exposição

Em todas as sessões experimentais, a concentração de alguns poluentes atmosféricos foi determinada. A mensuração do MP_{2.5} e MP₁₀ foi continuamente realizada pelo medidor PPD42NS (Shinyei, New York, NY, USA) (AUSTIN et al., 2015). As concentrações dos óxidos de nitrogênio (NO_x) foram mensuradas continuamente por um analisador modelo 42i (Thermo Fisher Scientific, Franklin, MA, USA). O contêiner onde foram realizadas as sessões experimentais está equipado com filtros *High Efficiency Particulate Arrestance* (HEPA) e biológicos capazes de reter os poluentes. Em ambas as condições, AmbPol e AmbFil o ar externo foi aspirado para o contêiner. Na condição AmbFil os filtros foram acionados, e na condição AmbPol não. Portanto, a “filtragem” ou exposição do ar externo eram feitos em tempo real à condução dos testes. É importante destacar que o contêiner de exposição se localiza a 20 metros de uma avenida com elevado tráfego, bem como 150 metros de outra com tráfego superior. De acordo com uma estimativa Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) aproximadamente 83.941 carros, 9.936 veículos movidos à combustão de diesel e 6.321 motocicletas transitam na avenida lateral ao contêiner e aproximadamente 5.299 veículos à diesel, 25.590 carros e 808 motos na avenida em frente ao contêiner. Não há atividade industrial ou queima de biomassas na região (CETESB, 2005).

4.2. Medidas antropométricas

A massa corporal foi aferida 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.

4.3. Teste incremental máximo

Após 5 min de aquecimento em ciclo ergômetro (Biotek 2100, Cefise, Nova Odessa, SP, Brasil) na potência de 30 Watts (W) e 70-80 rotações por minuto (rpm), a potência mecânica 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 forem reunidos: i. um aumento no VO_2 menor que $2,1 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ entre os dois últimos estágios, ii. a razão de troca respiratória maior que 1,1; c) valor $\geq 90\%$ da FC máxima predita pela idade ($220-\text{idade}$).

4.4. Protocolo de exercícios intervalado e contínuo

O aquecimento foi feito na potência de 30 W e 70-80 rpm por um período de 5 min. Após o aquecimento, os voluntários realizaram o protocolo de EIAI, sendo considerado 1 minuto de alta intensidade e 1 minuto de recuperação ativa. Ao todo, foram realizadas dez repetições de cada. A intensidade foi ajustada em acordo com as cargas relativas para cada voluntário a 100% e 40% do VO_2max para alta intensidade e recuperação ativa, respectivamente. Houve encorajamento verbal durante todo protocolo. Para ECBI foi considerada a carga relativa a 40% do VO_2max , com rotação entre 70 – 80 rpm. Para estabelecer a duração do ECBI, o trabalho total gerado no protocolo de EIAI foi convertido para a intensidade de 40% do VO_2max , e assim obteve-se a duração total do ECBI. O protocolo de exercícios foi proposto considerando as recomendações do ACSM para promoção da saúde (GARBER et al., 2011).

4.5. Coletas sanguíneas e preparação das amostras

O sangue foi coletado da veia braquial e mantido em temperatura ambiente por aproximadamente 10 min. Após esse período, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 min a 4°C para obtenção do soro. O soro obtido foi então aliquotado e armazenado a -80°C para posterior análise de citocinas e metabolômica.

5. CAPÍTULO II. Os benefícios para a saúde do exercício intervalado de alta intensidade podem ser mitigados pela poluição atmosférica da cidade de São Paulo?

5.1. Introdução

Recentemente o *The Health Effects Institute*, apresentou que no ano de 2016 a poluição atmosférica foi responsável por cerca de 6 milhões de óbitos (HEI, 2016). Além disso, o mesmo instituto declarou que 95% da população mundial vive em condições onde há baixa qualidade do ar, com destaque para os altos valores de MP_{2,5}. Considerando a cidade de São Paulo, foi demonstrado recentemente que a poluição atmosférica presente na cidade também está associada a elevada taxa de mortalidade (RIBEIRO et al., 2019). Adicionalmente, há associação entre o AmbPol e problemas cardiovasculares, como hipertensão e infarto (BOURDREL et al., 2017; BROOK et al., 2010; KUBESCH et al., 2015; MILLS et al., 2009). Estudos prévios também demonstraram que o AmbPol pode gerar a inflamação sistêmica, com a secreção de citocinas pró-inflamatórias e assim, depressão do sistema imune (CHEN et al., 2018; CUTRUFELLO; SMOLIGA; RUNDELL, 2012; GILES; KOEHLE, 2014; GRUZIEVA et al., 2017; HABERZETTL et al., 2016). É importante destacar que a inflamação sistêmica está associada com diabetes mellitus do tipo 2, doenças cardiovasculares e até mesmo com câncer (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2012).

Apesar dos problemas causados pela poluição atmosférica urbana, uma estratégia comum para promoção da saúde é a prática de EFA, como estabelecido pelo *American College of Sports Medicine* (ACSM) (GARBER et al., 2011). As recomendações do ACSM estão pautadas por alguns mecanismos de ação do organismo durante e após os EFA. Por exemplo, na recuperação após exercício há diminuição do débito cardíaco e ação de vasodilatadores locais, em conjunto, esses mecanismos levam a hipotensão após exercício (HALLIWILL et al., 2013). E ainda, os EFA podem evitar a inflamação sistêmica por promoverem a ação anti-inflamatória, devido as ações de contrações musculares, uma cascata de ocorrências leva a prevalência de citocinas anti-inflamatórias (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008, 2012). Nesse sentido, as recomendações do ACSM sugerem pelo menos 30 min de EFA por dia, cinco vezes na semana, por exemplo, exercício contínuo de ciclismo (30-50% do VO_{2max}). E ainda, é fortemente sugerido que o EFA com alta intensidade (igual ou superior a 80% do VO_{2max}), por pelo menos 20 min, três vezes na semana pode potencializar os efeitos benéficos do EFA, como o exercício intervalado de ciclismo, em alta intensidade.

Estudos prévios demonstraram que os benefícios para a saúde podem ser maiores quando o EIAI é praticado (DORNELES et al., 2016; GUIMARAES et al., 2010). Por exemplo, há maior efeito hipotensor após EIAI do que após ECBI (GUIMARAES et al., 2010). Há também maior estímulo para produção de citocinas anti-inflamatórias (DORNELES et al., 2016). Entretanto, é possível que a condição ambiental adversa, caracterizada pelas altas concentrações de poluentes, possa mitigar os efeitos benéficos induzidos pelo EIAI.

Como a intensidade do exercício está diretamente associada a VE (ZUURBIER et al., 2009), e o contato com os poluentes ocorre pelo sistema respiratório; quanto maior for a intensidade e portanto a VE, maior será o volume de ar e poluentes inalados (GILES; KOEHLE, 2014). Com os elevados valores de VE, há também a predominância da respiração oral; maiores frequência e profundidade respiratórias; dilatação dos brônquios, o que pode permitir maior deposição de poluentes e diminuição da temperatura do ar ventilado, causando ressecamento das mucosas nasal e traqueal (GILES; KOEHLE, 2014; GIORGINI et al., 2016). De forma conjunta, esses fatores levam a maior exposição aos poluentes atmosféricos. Alguns estudos prévios foram conduzidos para demonstrar como que a poluição atmosférica pode impactar, de forma negativa, a saúde durante o EFA.

Em um estudo com ciclistas que realizaram um teste contrarrelógio de 20-km, foi demonstrado que a exposição prévia, em uma câmara com $MP_{2,5}$, não alterou o tempo total para completar o teste. Porém, a exposição prévia levou à maior FC durante o teste (GILES; CARLSTEN; KOEHLE, 2012). Considerando a exposição ao $MP_{2,5}$ durante o exercício, foi demonstrado que não há diferença para PA, funções pulmonar e autonômica quando exercícios contínuos de baixa e alta intensidades são realizados (GILES et al., 2018; GILES; CARLSTEN; KOEHLE, 2018). Em outro estudo, com o mesmo desenho experimental, foi demonstrado que durante o exercício com baixa intensidade, houve maiores valores de VE e razão de troca respiratória (GILES et al., 2014). Coletivamente, esses resultados indicam que os efeitos negativos da exposição ao $MP_{2,5}$ da combustão de um motor a diesel não são potencializados pela intensidade do exercício (GILES et al., 2014, 2018, GILES; CARLSTEN; KOEHLE, 2012, 2018).

Com uma abordagem metodológica diferente, na qual os participantes se exercitavam na cidade, foi demonstrado que a poluição atmosférica urbana está associada a altos valores de PA após exercício de baixa intensidade (50-70% FC_{max}), o protocolo de exercício consistiu em 15 min em baixa intensidade, intervalado por 15 min em repouso (KUBESCH et al., 2015), esse protocolo de exercício foi escolhido para tentar representar o uso da bicicleta como transporte ativo. Inegavelmente, os estudos supracitados contribuirão para o avanço do

entendimento sobre EFA e poluição atmosférica. Entretanto, alguns pontos podem ser destacados na abordagem para o problema. Seria atraente também investigar exercícios com elevada intensidade e protocolo melhor controlado. As câmaras de exposição permitem elevado controle de variáveis ambientais, como vento, umidade relativa do ar e temperatura; e ainda a concentração de um único poluente. Porém, essa condição não representa ainda o cenário encontrado nas grandes cidades e pode inclusive mitigar os resultados encontrados. Todavia, há um grande desafio para os estudos que são conduzidos em ambiente urbano, pois não é possível que haja um rigoroso controle das variáveis já mencionadas.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi determinar as respostas cardiovasculares e inflamação sistêmica quando EIAI e ECBI são realizados em ambiente urbano com altas concentrações de poluentes. Considerando que não há informações na literatura sobre o possível efeito da máscara do analisador de gases como barreira física para os poluentes, um estudo adicional foi conduzido para apresentar as diferenças cardiorrespiratórias entre o EIAI e ECBI e ainda, testar a reprodutibilidade das medidas PA, FC, VE e volume total inalado.

5.2. Materiais e métodos

5.2.1. Participantes

Um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa foi considerado para o cálculo do tamanho da amostra (PASQUA, 2017). Utilizando a variável pressão arterial sistólica (PAS), poder de 0,80 e erro do tipo I de 0,05; nove voluntários foram sugeridos. Porém, considerando as medidas de metabolômica (estudo 2) e desistência de voluntários, dezessete voluntários foram considerados para o estudo. Dos dezessete voluntários que iniciaram os testes, dois precisaram abandonar por questões pessoais. Assim, quinze homens jovens, saudáveis e fisicamente ativos (FOGELHOLM et al., 2006) participaram como voluntários (idade $28,0 \pm 6,0$ anos; massa corporal $72,7 \pm 9,2$ kg; estatura $177,3 \pm 8,8$ cm e VO_{2max} $46,3 \pm 9,5$ ml·kg⁻¹·min⁻¹). Os critérios de exclusão foram: fumantes, terem alguma lesão muscular ou doenças associadas ao sistema cardiovascular, sistema imune e/ou metabolismo. Os participantes foram informados sobre os riscos associados ao protocolo experimental e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para participarem da pesquisa. O estudo foi conduzido em acordo com a Declaração de Helsinki e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Humanos, da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (CAAE: 88410218.2.0000.5391).

5.2.2. Desenho experimental

A figura 2 apresenta o desenho experimental completo das sessões de familiarização (estudo preliminar) e experimental (estudo principal). Para o estudo preliminar os voluntários visitaram o laboratório em cinco oportunidades, na primeira visita foram realizados as medidas antropométricas e o teste incremental máximo (TIM). Na segunda (teste) e terceira (re-teste) visitas os voluntários fizeram o EIAI. Na quarta (teste) e quinta (re-teste) visitas o ECBI. A FC e VE foram avaliadas durante todos os testes, e a PA pré e após cada teste. As sessões do estudo preliminar tiveram intervalo mínimo de 72 horas e máximo de 2 semanas. Aos participantes foi solicitado que evitassem exercícios físicos intensos, cafeína e bebidas alcoólicas nas 24 horas precedentes aos testes.

O estudo principal foi composto pela sexta até a nona visitas. Os testes foram conduzidos no contêiner para exposição ao AmbPol ou AmbFil. As visitas do estudo principal foram executadas de forma randomizada, em *cross-over* e *single-blind*. A FC foi medida durante os testes, a PA e as coletas de sangue venoso nos momentos pré, 10 min após e 1 hora após exercício. De modo similar ao estudo preliminar, foi pedido aos voluntários para evitarem exercícios físicos intensos, cafeína e bebidas alcoólicas nas 24 horas precedentes aos testes. As sessões do estudo principal tiveram intervalo de 7 dias entre as visitas, portanto, quatro semanas para conclusão do período experimental. Adicionalmente, como há variação dos poluentes atmosféricos ao longo do dia (SILVA JÚNIOR; OLIVEIRA; ANDRADE, 2009), os participantes visitaram o contêiner de exposição no mesmo horário.

Figura 2 - Desenho experimental dos estudos Preliminar e Principal. TIM. Teste incremental máximo. EIAI. Exercício Intervalado de Alta Intensidade. ECBI. Exercício Contínuo de Baixa Intensidade. PA. Pressão Arterial. FC. Frequência Cardíaca. VE. Ventilação. CS. Coleta de sangue. No estudo principal: Ambiente com ar filtrado . Ambiente com ar poluído .

5.2.3. Medidas de ventilação e volume total inalado

As medidas de ventilação e volume total inalado foram feitas durante os testes EIAI e ECBI do estudo preliminar. As variáveis mensuradas a cada respiração por meio 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.

5.2.4. Medidas cardiovasculares

A FC foi mensurada por cardio-frequencímetro (Polar S810; Kempele, Finland) durante todo o TIM, EIAI e ECBI dos estudos preliminar e principal. A PAS e pressão arterial diastólica (PAD) foram medidas por aparelho automático (BPA100-Microlife®, Widnau, Switzerland (STERGIOU et al., 2006)), nos momentos pré e 10 min após no estudo preliminar e pré, 10 min após e 1 hora após no estudo principal.

5.2.5. Perfil inflamatório

O perfil inflamatório foi determinado pela dosagem das citocinas IL-6, IL-10, TNF – α e VEGF. As amostras de soro 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 biotinilado 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 foram determinadas com base em um ajuste de curva padrão de intensidade de fluorescência versus $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

5.2.6. Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média, ($\pm$) desvio padrão e intervalo de confiança (IC 95%). Para testar a reprodutibilidade das variáveis cardiorrespiratórias no estudo preliminar, foram apresentados os valores de Coeficiente de correlação Intraclass (CCI) e coeficiente de variação (CV). O teste T pareado foi realizado para estabelecer as diferenças entre EIAI e ECBI das variáveis VE, volume total inalado e FC. Para avaliar a PA, foi realizada ANOVA de medias repetidas (exercício x momento). O *post hoc* de Tukey foi aplicado para identificar diferenças quando necessário. Como os valores de PA no momento pré foram diferentes entre EIAI e ECBI, os dados foram ajustados por delta (Δ - diferença entre momentos pré e após exercício), assim, foi avaliado se o efeito hipotensor do EIAI seria maior do que o do ECBI.

Para o estudo principal, a concentração dos poluentes, tal como temperatura e umidade do ar foram comparadas por teste t não pareado. A FC avaliada durante exercício foi comparada por teste t pareado. As medidas de PA e citocinas, nos momentos pré, 10 min após e 1 hora após foram avaliadas por ANOVA de medidas repetidas, considerando os fatores ambiente e momento. Quando necessário, o *post hoc* de Tukey foi utilizado para identificar as diferenças significativas. Devido a problemas técnicos as amostras de sangue de dois participantes foram desconsideradas para as análises de citocinas. O tamanho do efeito (TE) e Eta ao quadrado (η^2) foram determinados para comparação de médias e variâncias, respectivamente. O nível de significância estabelecido foi de $P < 0,05$. As análises foram feitas no *software* estatístico Statistica (Statistica 8, StataSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

5.3. Resultados

5.3.1. Estudo preliminar

Considerando as variáveis respiratórias VE ($t_{(14)} = -21,45$; $p < 0,01$; TE = 6,23) e volume total inalado ($t_{(14)} = -6,33$; $p < 0,01$; TE = 1,31); houve maiores valores para ambas durante o EIAI, quando comparado com ECBI. Os valores de VE e volume total inalado foram 2,3 e 1,2 vezes maiores, respectivamente (Figura 3). Adicionalmente, houve alta reprodutibilidade das variáveis para o EIAI e para o ECBI (tabela 2).

Figura 3 - Ventilação (VE) e volume total inalado durante os exercícios EIAI. Exercício intervalado de alta intensidade. ECBI. Exercício contínuo de baixa intensidade. ** $p < 0,01$ diferença entre os exercícios.

As demais variáveis cardiorrespiratórias determinadas durante o estudo preliminar são apresentadas na tabela 2. As sessões “reteste” do EIAI e ECBI foram utilizadas para comparações entre os exercícios. A ANOVA de medidas repetidas indicou interação estatisticamente significativa ($F_{(1, 14)} = 5,65$; $p = 0,03$; $\eta^2 = 0,28$) para a PAS. Os testes *post hoc* demonstraram: i. efeito hipotensor para ambos os exercícios ($p < 0,01$), ii. para o momento pré, que os valores de PAS foram maiores para o EIAI do que para ECBI ($p < 0,01$). Além disso, houve também efeito principal para o tempo ($F_{(1, 14)} = 28,94$; $p < 0,01$; $\eta^2 = 0,67$), sendo que, os valores após exercício foram menores do que os valores do momento pré ($p < 0,01$). Considerando que houve diferença entre os exercícios para os valores pré da PAS, os dados foram ajustados por delta (valor 10 min após – valor pré) para estabelecer se o efeito hipotensor do EIAI é realmente maior do que o ECBI. O teste T pareado ($t_{(14)} = 2,38$; $p < 0,01$; TE = 0,77) demonstrou que o efeito hipotensor no EIAI ($-10,6 \pm 7,03$ mmHg) foi maior do que no ECBI ($-5,0 \pm 7,43$ mmHg). Para a PAD não houve interação ou efeito principal estatisticamente significativas ($F_{(1, 14)} = 0,76$; $p = 0,39$; $\eta^2 = 0,05$). A FC durante o exercício, foi em média, maior para EIAI do que para o ECBI ($t_{(14)} = -21,32$; $p < 0,01$; 5,60).

Tabela 2 - Variáveis cardiorrespiratórias do estudo preliminar.

		Exercício intervalado de alta intensidade				Exercício contínuo de baixa intensidade			
	Momento	Teste	Reteste	CCI	CV (%)	Teste	Reteste	CCI	CV (%)
FC (bpm)	Durante	166,29 ± 9,38	163,22 ± 9,34	0,95**	1,32	107,54 ± 8,84	108,17 ± 10,31	0,88**	0,41
PAS (mmHg)	Pré	124,13 ± 8,91	127,33 ± 8,59	0,66*	1,80	121,73 ± 8,67	121,60 ± 7,09	0,19	0,08
	Após	116,20 ± 6,41	116,73 ± 8,42	0,82**	0,32	119,87 ± 9,54	116,60 ± 9,75	0,33	1,96
PAD (mmHg)	Pré	73,67 ± 7,47	72,27 ± 6,87	0,76**	1,36	73,20 ± 6,33	74,27 ± 7,16	0,16	1,03
	Após	73,00 ± 10,68	73,47 ± 6,58	0,52	0,45	71,87 ± 6,12	72,60 ± 6,80	0,82**	0,71
VE (L·min ⁻¹)	Durante	96,75 ± 12,42	93,65 ± 11,8	0,95**	2,30	40,89 ± 5,11	41,22 ± 5,04	0,88**	0,01
V. Total I. (L)	Durante	1935,07 ± 248,41	1873,04 ± 237,29	0,95**	2,30	1579,63 ± 208,71	1591,23 ± 193,43	0,88**	0,05

Os dados são média ± DP. FC. Frequência cardíaca. PAS. Pressão arterial sistólica. PAD. Pressão arterial diastólica. VE. Ventilação. V. Total. I. Volume total inalado. CCI. Coeficiente de correlação intraclasse. CV. Coeficiente de variação. **p < 0.01.

5.3.2. Estudo principal

5.3.2.1. Concentrações dos poluentes

Como esperado, a concentração de todos os poluentes foi maior para o AmbPol quando comparado com o AmbFil (figura 4). Adicionalmente, os valores observados para o MP e os gases NO e NO₂ no AmbPol estão acima do recomendado pela OMS. Por exemplo, os valores de média diária anual para MP_{2,5}, MP₁₀, e NO₂ são 10, 20 e 40 µg·m⁻³, respectivamente.

Figura 4 - Concentração dos poluentes nas sessões experimentais. EIAI. Exercício intervalado de alta intensidade. ECBI. Exercício contínuo de baixa intensidade. AmbFil. Ambiente com ar filtrado. AmbPol. Ambiente com ar poluído. MP_{2,5}: Material particulado 2,5µm. MP₁₀: Material particulado 10 µm. NO: Óxido nítrico. NO₂: Dióxido de nitrogênio. **p < 0,01 Comparação entre ambientes poluído e com ar filtrado.

Para as variáveis temperatura ($t_{(14)} = 1,16$; $p = 0,26$; $TE = 0,45$) e umidade relativa do ar ($t_{(14)} = 1,01$; $p = 0,33$; $TE = 0,36$), não houve diferença durante as sessões de EIAI. O mesmo resultado foi observado durante o ECBI para temperatura ($t_{(14)} = -1,30$; $p = 0,22$; $TE = 0,41$) e umidade Relativa do ar ($t_{(14)} = 0,79$; $p = 0,44$; $0,19$).

Tabela 3 - Temperatura e umidade relativa do ar (UR).

		AmbFil	AmbPol
EIAI	Temperatura (°C)	20,93 ± 1,43	21,48 ± 0,97
	UR (%)	62,27 ± 8,83	64,76 ± 4,98
ECBI	Temperatura (°C)	20,85 ± 1,05	20,35 ± 1,30
	UR (%)	64,53 ± 5,29	65,53 ± 5,19

Dados são Média ± DP. EIAI. Exercício intervalado de alta intensidade. ECBI. Exercício contínuo de baixa intensidade. AmbFil. Ambiente com ar filtrado. AmbPol. Ambiente com ar poluído.

5.3.2.2. Pressão arterial e frequência cardíaca

A figura 5 apresenta os valores de PA observados nas sessões experimentais do estudo principal. Para o EIAI houve interação estatisticamente significativa ($F_{(2, 28)} = 4,30$; $p = 0,02$; $\eta^2 = 0,23$). Os testes *post hoc* indicaram: i. em AmbFil os valores de PAS 10 min após ($p < 0,01$) e 1 hora após ($p < 0,01$) foram menores do que no momento pré, ou seja, houve efeito hipotensor do exercício e ainda, ii. A PAS foi menor 1 hora após do que 10 min após, portanto, o efeito hipotensor foi também progressivo. iii. Foi demonstrado que no AmbPol, apenas 1 hora após houve o efeito hipotensor ($p < 0,01$). iv. Comparando os ambientes, houve uma tendência para diferença no momento 1 hora após, no qual os valores de PAS foram menores para o AmbFil ($p = 0,067$). Considerando ainda o EIAI, houve efeito principal para o momento ($F_{(2, 28)} = 24,82$; $p < 0,01$, $\eta^2 = 0,64$), no qual, os testes *post hoc* indicaram menores valores de PAS 10 min após ($p < 0,01$) e 1 hora após ($p < 0,01$) do que no momento pré.

Para o ECBI houve interação estatisticamente significativa ($F_{(2, 28)} = 3,41$; $p = 0,047$; $\eta^2 = 0,19$), sendo que, os testes *post hoc* indicaram que apenas no AmbFil houve menores valores de PAS nos momentos 10 min após ($p < 0,01$) e 1 hora após ($p < 0,01$), quando comparados com o momento pré. Houve também efeito principal do momento ($F_{(2, 28)} = 7,83$; $p < 0,01$; $\eta^2 = 0,36$). Os testes *post hoc* indicaram menores valores de PAS 10 min após ($p < 0,01$) e 1 hora após ($p < 0,01$) quando comparado com o momento pré. Para a PAD não houve interação estatisticamente significativa para o EIAI ($F_{(2, 28)} = 0,93$; $p = 0,40$; $\eta^2 = 0,06$) e para o ECBI ($F_{(2, 28)} = 1,58$; $p = 0,22$; $\eta^2 = 0,10$). Também não houve diferença para a FC média durante o teste EIAI ($T_{(14)} = 0,73$; $p = 0,47$; $TE = 0,09$) em AmbPol ($150,00 \pm 12,21$ bpm) e AmbFil ($151,16 \pm 12,29$ bpm), o mesmo foi observado para o ECBI ($T_{(14)} = 0,90$; $p = 0,38$; $TE = 0,21$), quando realizado em AmbPol ($108,16 \pm 14,17$ bpm) e em AmbFil ($110,77 \pm 10,95$ bpm).

Figura 5 - Pressão arterial durante as sessões experimentais. AmbFil. Ambiente com ar filtrado. AmbPol. Ambiente com ar poluído. PAS. Pressão arterial sistólica. PAD. Pressão arterial diastólica. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ diferença para o momento pré. §§ $p < 0,01$ diferença para momento 10 min após. # $p < 0,05$ diferença entre os exercícios. b. Efeito principal do momento ($p < 0,05$).

5.3.2.3. Perfil inflamatório

Os valores de média, DP e IC 95% das concentrações de citocinas são apresentadas nas tabelas 4 (EIAI) e 5 (ECBI). Houve interação estatisticamente significativa para IL-6 após EIAI ($F_{(2, 24)} = 3,46$; $p = 0,047$; $\eta^2 = 0,22$). O *post hoc* indicou: i. maiores valores 1 hora após quando comparado com os momentos pré ($p < 0,01$) e também 10 min após ($p < 0,01$). ii. Nos momentos 10 min após ($p < 0,01$) e 1 hora após ($p < 0,01$) as concentrações de IL-6 foram superiores ao momento pré. Também houve efeito principal do momento ($F_{(2, 24)} = 10,88$; $p < 0,01$; $\eta^2 = 0,47$). Sendo que, o *post hoc* indicou diferenças entre os momentos pré e 1 hora após ($p < 0,01$).

Para a IL-10, houve interação estatisticamente significativa após EIAI ($F_{(2, 24)} = 5,18$; $p = 0,01$; $\eta^2 = 0,30$). Com *post hoc* indicando: i. 1 hora após há maior concentração do que os momentos pré ($p < 0,01$) e 10 min após ($p < 0,01$). ii. Comparando os ambientes, no momento 1 hora após há maior concentração de IL-10 no AmbFil do que no AmbPol ($p < 0,01$). Também

houve efeito principal do momento ($F_{(2, 24)} = 5,27$; $p < 0,01$; $\eta^2 = 0,30$), no qual os valores observados 1 hora após foram maiores do que 10 min após ($p < 0,01$).

Tabela 4 - Concentrações das citocinas nas sessões de exercício intervalado de alta intensidade.

AmbFil			AmbPol	
<u>IL-6^b (pg·mL⁻¹)</u>				
Pré	2,92 ± 2,18	(4,13 - 1,71)	4,07 ± 4,75	(1,44 - 6,70)
10 min após	2,85 ± 1,47#	(3,67 - 2,03)	5,11 ± 6,59	(1,45 - 8,77)
1 hora após	4,02 ± 2,12#	(5,20 - 2,84)	6,78 ± 7,11§*	(2,84 - 10,72)
<u>IL-10^b (pg·mL⁻¹)</u>				
Pré	2,67 ± 1,64	(1,76 - 3,58)	2,75 ± 1,45	(1,95 - 3,55)
10 min após	2,33 ± 1,54	(1,48 - 3,18)	2,10 ± 0,99	(1,55 - 2,65)
1 hora após	5,60 ± 5,30#§*	(2,66 - 8,54)	3,10 ± 2,21	(1,87 - 4,33)
<u>TNF – α (pg·mL⁻¹)</u>				
Pré	6,06 ± 3,04	(4,37 - 7,75)	6,79 ± 4,25	(4,43 - 9,15)
10 min após	6,13 ± 3,52	(4,18 - 8,08)	6,35 ± 3,53	(4,39 - 8,31)
1 hora após	6,20 ± 3,26	(4,39 - 8,01)	6,56 ± 2,85	(4,98 - 8,14)
<u>VEGF (pg·mL⁻¹)</u>				
Pré	8,14 ± 14,64	(0,02 - 16,26)	11,96 ± 17,50	(2,25 - 21,67)
10 min após	12,68 ± 18,55	(2,39 - 22,97)	12,51 ± 22,52	(0,02 – 25,00)
1 hora após	13,32 ± 23,36	(0,36 - 26,28)	13,76 ± 24,94	(-0,07 - 27,59)

Os dados são Média ± DP e (IC 95%). IL. Interleucina. TNF-α. Fator de Necrose Tumoral – alfa. VEGF. Fator de Crescimento Endotelial Vascular. * $p < 0,01$ diferença para o momento pré. § $p < 0,01$ diferença para momento 10 min após. # $p < 0,01$ Diferença entre os ambientes no mesmo momento. ^b Efeito principal do momento ($p < 0,05$).

Analisando as citocinas medidas nas sessões experimentais do ECBI, não houve interação para a IL-6 ($F_{(2, 24)} = 1,70$; $p = 0,20$; $\eta^2 = 0,12$), entretanto, houve efeito principal do momento ($F_{(2, 24)} = 3,76$; $p = 0,03$; $\eta^2 = 0,23$). Os resultados dos testes *post hoc* indicaram maiores valores de IL-6 1 hora após do que no momento pré ($p < 0,05$).

Tabela 5 - Concentrações das citocinas nas sessões de exercício contínuo de baixa intensidade.

AmbFil			AmbPol	
<u>IL-6^b (pg·mL⁻¹)</u>				
Pré	2,30 ± 0,93	(1,78 - 2,82)	4,26 ± 7,08	(0,33 - 8,19)
10 min após	2,30 ± 0,82	(1,85 - 2,75)	4,96 ± 8,12	(0,46 - 9,46)
1 hora após	3,13 ± 1,90	(2,08 - 4,18)	4,83 ± 7,38	(0,74 - 8,92)
<u>IL-10 (pg·mL⁻¹)</u>				
Pré	2,78 ± 2,06	(1,64 - 3,92)	2,52 ± 1,58	(1,64 - 3,40)
10 min após	2,51 ± 1,60	(1,62 - 3,40)	2,27 ± 1,58	(1,39 - 3,15)
1 hora após	2,58 ± 1,47	(1,76 - 3,40)	2,41 ± 1,28	(1,70 - 3,12)
<u>TNF – α (pg·mL⁻¹)</u>				
Pré	6,39 ± 3,11	(4,66 - 8,12)	6,29 ± 3,17	(4,53 - 8,05)
10 min após	6,42 ± 3,04	(4,73 - 8,11)	6,37 ± 3,88	(4,22 - 8,52)
1 hora após	6,35 ± 3,40	(4,46 - 8,24)	6,14 ± 3,85	(4,00 - 8,28)
<u>VEGF (pg·mL⁻¹)</u>				
Pré	10,00 ± 11,85	(3,43 - 16,57)	7,82 ± 12,33	(0,98 - 14,66)
10 min após	7,07 ± 10,82	(1,07 - 13,07)	20,60 ± 31,21	(3,29 - 37,91)
1 hora após	7,99 ± 11,24	(1,76 - 14,22)	10,26 ± 13,77	(2,62 - 17,90)

Os dados são Média ± DP e (IC 95%) IL. Interleucina. TNF-α. Fator de Necrose Tumoral – alfa. VEGF. Fator de Crescimento Endotelial Vascular. ^b. Efeito principal do momento (p < 0,05).

5.4. Discussão

“São São Paulo (...)
São oito milhões de habitantes
De todo canto em ação (...)
Por mil chaminés e carros
Caseados à prestação
Porém com todo defeito
Tem carrego no meu peito” - (e pulmão).
 São São Paulo - (TOM ZÉ, 1968).

Os resultados do presente estudo indicam que o EIAI realizado em AmbPol causa alterações em algumas variáveis fisiológicas relacionadas à saúde, tais como: i. inibição do efeito hipotensor do exercício 10 min após. ii. Menor ação do efeito hipotensor 1 hora após exercício. iii. Aumento da IL-6 e inibição da IL-10. Considerando o ECBI, houve inibição do efeito hipotensor nos momentos 10 min e 1 hora após exercício e não houve alteração de citocinas pró ou anti-inflamatórias. Durante o exercício não houve diferença para a FC do EIAI e do ECBI. Coletivamente, os achados sinalizam que durante o exercício, o estresse fisiológico da atividade supera o estresse fisiológico causado pelo AmbPol da cidade de São Paulo. Todavia, devido aos resultados observados para a PAS e inflamação sistêmica, pode-se inferir que após EIAI parâmetros de saúde são afetados pela poluição atmosférica da cidade de São Paulo.

5.4.1. Abordagem metodológica

Apesar de alguns estudos prévios demonstrarem que a poluição atmosférica pode afetar a saúde (BROOK et al., 2010; OUDIN; FORSBERG; JAKOBSSON, 2012; WEICHENTHAL et al., 2011; ZHENG et al., 2015), os resultados sobre a interação entre EFA e poluição atmosférica ainda são conflitantes. Algumas explicações podem ser apresentadas, à saber. i. Diferenças metodológicas para condução dos estudos, por exemplo, câmaras de exposição vs situações mais próximas do cenário urbano das grandes cidades. ii. Protocolo de exercício. Estudos importantes que consideraram a interação entre EFA e poluição atmosférica utilizaram câmaras de exposição para MP_{2,5} (oriundo de motores de combustão à diesel) ou gás, geralmente o O₃ (GILES et al., 2014, 2018, GILES; CARLSTEN; KOEHLE, 2012, 2018; MILLER et al., 2016). Essa abordagem é atraente porque permite alto controle do ambiente (temperatura, vento e UR); contudo, está distante do cenário encontrado nos grandes centros

urbanos, em especial pela variedade de poluentes e suas respectivas fontes (carros movidos à combustão de diesel, gasolina, atividade industrial etc.).

Por outro lado, há um desafio a ser superado para a condução de estudos dessa temática nas grandes cidades. Considerando que há baixo controle de variáveis que podem influenciar a concentração dos poluentes (temperatura, velocidade do vento e umidade relativa do ar). Diante disso, nosso estudo buscou atender a demanda pelo alto controle do ambiente e ainda considerar um cenário urbano com altas concentrações de poluentes. Considerando nossos resultados acerca da concentração dos poluentes, o desafio de se obter um ambiente com ar filtrado, portanto com baixas concentrações de poluentes foi bem-sucedido. É importante destacar também que há certa variação na concentração dos poluentes de acordo com o dia da semana e horário (SILVA JÚNIOR; OLIVEIRA; ANDRADE, 2009). Assim, os voluntários realizaram as visitas do estudo principal no mesmo dia da semana, em quatro semanas consecutivas.

Outro fator que colabora para resultados conflitantes descritos na literatura é a escolha do protocolo experimental. Por exemplo, alguns estudos conduzidos em câmara de exposição (MILLER et al., 2016) ou cenário urbano (KUBESCH et al., 2015) consideraram exercícios de baixa intensidade, o que não representa a prática cotidiana para a promoção da saúde. Para o estudo de Miller et al. (2016), o intuito era que a VE ficasse ligeiramente superior quando comparado ao repouso. Para o estudo de Kubesch et al. (2015), era que a VE se aproximasse da realidade de ciclistas que usam a bicicleta como transporte ativo. Outros estudos consideram exclusivamente exercícios contínuos (GILES et al., 2014, 2018; GILES; CARLSTEN; KOEHLE, 2018), porém para participantes fisicamente ativos manterem-se em intensidade elevada (acima de 80% do VO_{2max}) de forma contínua não é uma tarefa exequível.

Por fim, foi testado também se o desempenho em 20 km de teste contrarrelógio (ciclismo) seria afetado pela exposição prévia ao $MP_{2.5}$, apesar da intensidade do exercício ter sido autorregulada, o protocolo de exposição pode ter atenuado as possíveis respostas do organismo (GILES; CARLSTEN; KOEHLE, 2012). Considerando os aspectos acima mencionados, o protocolo de EIAI do presente estudo foi escolhido por permitir elevados valores de VE e também por ser indicado para aprimorar diversos parâmetros de saúde (CARTER; RAY, 2015; DE SOUZA et al., 2018; DORNELES et al., 2016; GARBER et al., 2011).

5.4.2. Pressão arterial e frequência cardíaca

O efeito hipotensor após exercício é esperado, devido a diminuição do débito cardíaco e aumento da vasodilatação periférica, induzindo assim menor resistência vascular periférica

(HALLIWILL, 2001). Adicionalmente, foi demonstrado que após exercício com maior intensidade, o efeito hipotensor pode ser potencializado (BOUTCHER; BOUTCHER, 2017), o que foi corroborado pelos resultados observados para a PAS no estudo preliminar. Nesse sentido, o EIAI é uma metodologia atraente para induzir uma adaptação positiva para o sistema cardiovascular. Todavia, os nossos resultados indicaram que após EIAI em AmbPol o efeito foi inibido 10 min após exercício, e ainda, apesar de ter sido observado o efeito hipotensor 1 hora após exercício, houve uma tendência indicando que a queda da PAS observada nesse momento não foi tão pronunciada quando comparado com o EIAI em AmbFil ($p = 0,067$).

Tem sido proposto que ao entrar em contato com os poluentes, em especial o $MP_{2,5}$, há uma cascata de eventos promovida pelo organismo como mecanismo de defesa ao agente estressor. A primeira delas é a liberação de citocinas pró-inflamatórias, caracterizando assim, um perfil de inflamação sistêmica (BROOK et al., 2009). Em seguida, há um quadro de estresse oxidativo o que prejudica o controle autonômico do coração (BOURDREL et al., 2017; BROOK et al., 2010; KUBESCH et al., 2015). Assim, possivelmente, há maiores ação do tônus simpático e *stiffness* da parede arterial, o que pode prejudicar a vasodilatação periférica e explicar o fato de não termos observado o efeito hipotensor da PAS 10 min após EIAI em AmbPol (KUBESCH et al., 2015). Todavia, no momento 1 hora após houve efeito hipotensor em AmbPol. Especula-se que os resultados negativos para a PAS sejam mitigados com o passar do tempo. Essa explicação é considerável, uma vez que, devido à alta intensidade, é esperado que o efeito hipotensor do exercício seja potencializado progressivamente após o término do exercício (CORNELISSEN et al., 2010; HALLIWILL et al., 2013).

Para o ECBI, realizado em AmbPol, não houve efeito hipotensor nos momentos 10 min e 1 hora após. Alguns pontos podem ser indicados para tal resultado, primeiro que a poluição atmosférica impactou negativamente a PAS. E é interessante notar que para o mesmo exercício, realizado em AmbFil, houve menores valores de PAS 10 min após e 1 hora após. Adicionalmente, nessa intensidade de exercício há um menor efeito hipotensor (ΔPAS : -5,0 mmHg; como demonstrado no nosso estudo preliminar). Portanto, considerando os resultados para o ECBI em AmbPol e AmbFil, nessa intensidade de exercício especula-se que o efeito fisiológico para a PAS seja mitigado ao longo do processo de recuperação em AmbPol.

A FC mensurada durante o EIAI e ECBI não apresentou diferença na comparação entre os ambientes. Nossos resultados estão alinhados com um estudo prévio que considerou exercícios contínuos (30 e 60% do VO_{2max}) de ciclismo (GILES et al., 2014). Durante a transição do repouso para o exercício, há elevada ação simpática e portanto aumento da FC, concomitantemente, tem sido indicado que a poluição atmosférica pode aumentar o tônus

simpático (NYHAN; MCNABOLA; MISSTEAR, 2014). Portanto, possivelmente os estímulos fisiológicos da adaptação ao exercício superam os efeitos da poluição atmosférica (GILES et al., 2014). Coletivamente, baseado nos nossos resultados para PA e FC, podemos inferir que os mecanismos fisiológicos de adaptação durante o exercício sobrepõem os possíveis malefícios da poluição atmosférica. Todavia, durante a primeira hora de recuperação os benefícios induzidos pelo esforço físico são mitigados pelo AmbPol.

5.4.3. Perfil inflamatório

A prática de EFA estimula a produção de interleucinas pró e anti-inflamatórias, tem sido proposto que o aumento de IL-6 ocorre para estimular a IL-10, e assim, estabelecer um balanço positivo de anti-inflamação sistêmica (PEDERSEN, 2011). Adicionalmente, tem sido indicado que no EFA com maior intensidade (e. g. EIAI), há maior atividade muscular o que pode gerar maior efeito anti-inflamatório (DORNELES et al., 2016). Esses pressupostos foram confirmados em nossos resultados, 1 hora após a prática de EIAI houve maior concentração de IL-6, independente do ambiente (efeito principal do momento). Contudo, analisando os resultados das concentrações de IL-6, houve diferença estatisticamente significativa apenas para o AmbPol, 1 hora após exercício. E ainda, a IL-10 teve maior concentração apenas no AmbFil. Ou seja, o AmbPol inibe a ação anti-inflamatória da IL-10 e estimula a secreção de IL-6 (pró-inflamatória).

Os resultados observados na presente tese de doutorado estão alinhados com o que se descreveu até então sobre saúde e perfil inflamatório após exposição à poluentes (BERNSTEIN et al., 2004; WOLF et al., 2016), mas em nosso conhecimento, é a primeira vez que um estudo descreve como o exercício de alta intensidade pode potencializar o efeito negativo da poluição atmosférica. Nesse sentido, é interessante notar que os resultados observados após EIAI não ocorreram quando o ECBI foi realizado, tanto em AmbPol quanto em AmbFil. Uma possível explicação para esse achado está relacionada com o menor volume de ar inalado, e então, menos poluentes. Mas essa questão ainda não está completamente elucidada. Pois, naturalmente, durante o ECBI houve mais poluentes inalados no AmbPol do que no AmbFil (como demonstrado pela concentração de poluentes nos dois ambientes). Assim, nossos resultados sugerem que além do volume total de poluentes inalados, como os poluentes são inalados talvez também deva ser considerado.

Previamente foi indicado que com maiores valores de VE, mais mecanismos de defesa do organismo são superados e portanto, há maior exposição aos poluentes (GILES; KOEHLE, 2014; GIORGINI et al., 2016; NIINIMAA et al., 1980; ZUURBIER et al., 2009). Portanto,

pode-se especular que por ter menores valores de VE, os malefícios do AmbPol para o perfil inflamatório não foram tão pronunciados. Todavia, recomendamos cautela ao extrapolar esses resultados, pois nosso estudo não foi desenhado para testar exclusivamente se a maior taxa de VE realmente causa maior efeito negativo à saúde.

5.5. Conclusão

A poluição atmosférica da cidade de São Paulo causa mais efeitos adversos para saúde cardiovascular e inflamação sistêmica quando o EIAI é realizado. Sugerimos que os EFA sejam evitados em ambientes com essas condições, entretanto, se houver a prática, o ECBI pode ter menos efeitos negativos para a saúde do que o EIAI.

6. CAPÍTULO III. Exercício intervalado de alta intensidade e poluição atmosférica da cidade de São Paulo: Efeitos sobre vias metabólicas baseadas em uma abordagem metabolômica.

6.1. Introdução

A exposição à poluição atmosférica é considerada um fator de alto risco para a saúde de moradores de grandes centros urbanos, como por exemplo, a cidade de São Paulo (RIBEIRO et al., 2019). E um estudo recente demonstrou que a poluição da cidade São Paulo, essencialmente oriunda dos veículos automotores, está associada com aumento das taxas de mortalidade (RIBEIRO et al., 2019). Esse resultado apresenta o alto impacto social da poluição para a saúde, considerando que atualmente há mais de 20 milhões de moradores na região metropolitana de São Paulo (IBGE, 2018). Diante disso, a comunidade científica tem investigado como poluição atmosférica e alguns marcadores de saúde interagem. Os estudos iniciais acerca do tema buscaram entender como que parâmetros cardiorrespiratórios eram afetados pela exposição ao AmbPol (BOUHUYS; BECK; SCHOENBERG, 1978; SAMET et al., 2000; SEATON et al., 1995).

Adicionalmente, tem sido sugerido que a poluição atmosférica também pode impactar o metabolismo, por exemplo, gerando maior propensão para desenvolvimento de obesidade e diabetes mellitus do tipo 2 (JANGHORANI; MOMENI; MANSOURIAN, 2014; PARK et al., 2015; RAJAGOPALAN; BROOK, 2012). Porém, os mecanismos que explicam como a exposição aos poluentes impacta o metabolismo ainda não estão completamente elucidados. Alguns motivos têm sido indicados, como inflamação sistêmica (LUCHT et al., 2019), estresse oxidativo (RAJAGOPALAN; BROOK, 2012), elevada ação do sistema nervoso simpático (BROOK et al., 2010; RAJAGOPALAN; BROOK, 2012), e resistência à insulina (SUN et al., 2009). É interessante notar que todos esses mecanismos estão associados ao balanço energético (BAYEVA; SAWICKI; ARDEHALI, 2013; COX; CLARKE, 2014). Estudos prévios demonstraram por meio de análise de metabolômica que a exposição ao AmbPol pode afetar o metabolismo de lipídios e aumentar a produção de corpos cetônicos em ratos (MILLER et al., 2015) e humanos (MILLER et al., 2016; VAN VELDHoven et al., 2019).

Por sua vez, o EIAI emerge como possibilidade para controlar ou reduzir os riscos para desenvolvimento de doenças relacionadas ao metabolismo. E a comunidade científica tem demonstrado, que o EIAI diminui a chance de desenvolvimento de disfunções metabólicas (KUEHNBAUM et al., 2014), ajuda na prevenção da obesidade (WEWEGE et al., 2017).

promovendo o metabolismo de lipídios (TALANIAN et al., 2007). Entretanto, ainda não está estabelecido se os benefícios promovidos pelo EIAI também são observados após a prática em ambientes com altas concentrações de poluentes.

Na transição do repouso para o exercício, há aumento da VE. Em intensidades elevadas, como no caso do EIAI, os valores de VE são ainda mais pronunciados. Portanto, mais poluentes são inalados. Até o momento não se sabe se os benefícios para saúde, promovidas pelo EIAI e descritos pela comunidade científica (GIBALA et al., 2012; GIBALA; MCGEE, 2008; GONZALEZ et al., 2016; KUEHNBAUM et al., 2014; MONLEON et al., 2014) serão mantidos após realização do exercício em AmbPol. Com relação as possibilidades metodológicas na abordagem para o problema, estudos prévios utilizaram uma técnica para análise ampla de metabólitos, a metabolômica. Foi demonstrado que ela é uma ferramenta eficaz na avaliação do metabolismo após EFA (NIEMAN et al., 2012, 2013, 2014) e também das alterações metabólicas após exposição aos poluentes (VAN VELDHOFEN et al., 2019). Em um interessante estudo, foi demonstrado inclusive, que após exercício de baixa intensidade em uma câmara de exposição ao O₃, as vias metabólicas relacionadas ao metabolismo de lipídios e produção de corpos cetônicos são impactadas em ratos (MILLER et al., 2015) e humanos (MILLER et al., 2016).

Apesar dos avanços recentes para a área, ao menos em nosso conhecimento, nenhum estudo considerou, apropriadamente, o EFA e a exposição ao AmbPol. O estudo conduzido pela Designia Miller et. al. (2016) traz resultados importantes sobre quais vias metabólicas são afetadas após exposição à câmara de O₃, todavia algumas limitações metodológicas de vem ser citadas. O estudo foi desenhado para comparar as repostas metabólicas de humanos após duas horas de exercício em exposição, com seis horas de exposição de ratos em repouso (MILLER et al., 2015). Pode-se entender então, que o exercício foi utilizado como forma de “acelerar” o processo exposição. De fato, o protocolo experimental (15 min em repouso e 15 min pedalando em baixa intensidade ~20 - 30% do VO₂max⁹). Outro fator limitante é a exposição ao poluente. Foi considerado apenas o O₃ e não demais poluentes importantes, por exemplo o MP_{2.5}. Essa limitação prejudica a extrapolação dos resultados para condições próximas à realidade dos grandes centros urbanos, com altas concentrações de distintos poluentes.

Em síntese, estudos prévios demonstraram que a exposição ao AmbPol promove alterações no metabolismo, todavia não se sabe exatamente como, acredita-se que o principal

⁹ Baseado nos dados do TIM da presente tese de doutorado.

fator seja o balanço energético. Adicionalmente, não está estabelecido se o EIAI realmente pode potencializar os efeitos negativos da poluição atmosférica. Por fim, considerando diversos estudos prévios sobre o uso da metabolômica, pode-se afirmar que essa é uma saída atraente para avaliação ampla do metabolismo. Em especial porque a técnica analítica permite, a partir de uma pequena amostra de sangue, a exploração ampla das vias metabólicas. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi determinar como a exposição à poluição atmosférica da cidade de São Paulo afeta as vias metabólicas após EIAI e ECBI.

6.2. Materiais e métodos

6.2.1. Participantes

Para a determinação do número de participantes um estudo prévio foi conduzido, com o protocolo de EIAI e dois participantes. Com um poder preditivo de 0,80; os cálculos de *power analysis* realizados no software Metaboanalyst 4.0® (<http://www.metaboanalyst.ca/>) (CHONG et al., 2018; XIA et al., 2009) indicaram que para o presente estudo seria necessário pelo menos 10 participantes. Entretanto, considerando possíveis desistências e problemas técnicos, participaram do estudo como voluntários quatorze homens jovens, saudáveis e fisicamente ativos (FOGELHOLM et al., 2006) (idade $27,5 \pm 5,9$ anos; massa corporal $73,3 \pm 9,2$ kg; estatura $177,2 \pm 9,1$ cm e $VO_2\text{max}$ $45,9 \pm 9,8$ ml·kg⁻¹·min⁻¹). Os critérios de exclusão foram: fumantes, terem alguma lesão muscular ou doenças associadas ao sistema cardiovascular, imune e metabólico. Os participantes foram informados sobre os riscos associados ao protocolo experimental e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para participarem da pesquisa. O estudo foi conduzido em acordo com a Declaração de Helsinki e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Humanos, da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (CAAE: 88410218.2.0000.5391).

6.2.2. Desenho experimental

Para o estudo 2 foram consideradas as quatro últimas vistas do protocolo experimental composto no estudo 1 (Figura 6). Assim, as visitas foram randomizadas e contrabalanceadas; os participantes não recebem informações sobre qual ambiente estavam expostos. É importante destacar que houve um intervalo de 7 dias entre as visitas, portanto, quatro semanas para conclusão do período experimental. Adicionalmente, como há variação dos poluentes atmosféricos ao longo do dia (SILVA JÚNIOR; OLIVEIRA; ANDRADE, 2009), os participantes visitaram o contêiner de exposição no mesmo horário. Além de ter sido solicitado

que os participantes evitassem exercícios físicos intensos, cafeína e bebidas alcoólicas nas 24 horas precedentes aos testes, por se tratar de uma medida sensível à dieta (SILVA JÚNIOR; OLIVEIRA; ANDRADE, 2009), os voluntários preencheram um recordatório alimentar as 24 horas prévias a primeira visita. O mesmo documento foi utilizado para padronização da dieta nas 3 três visitas subsequentes.

Figura 6 - Desenho experimental do estudo 2. EIAI. Exercício Intervalado de Alta Intensidade. ECBI. Exercício Contínuo de Baixa Intensidade. PA. Pressão Arterial. CS. Coleta de Sangue. FC. Frequência Cardíaca. Ambiente com ar filtrado . Ambiente com ar poluído .

6.2.3. Aquisição do espectro e identificação dos metabólitos

Os espectros foram adquiridos utilizando um espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Inova Agilent (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EUA). A RMN operou a uma frequência de ressonância de 600 MHz e temperatura constante de 25 °C. Um total de 256 decaimentos de indução livre foram realizados em 8000 Hertz de largura espectral, com tempo de aquisição de 4 segundos e “*recycle delay*” de 1,5 segundos. A fase espectral, correção de linha de base, identificação e quantificação dos metabólitos da amostra de sangue foram analisadas usando o software Chenomx NMR Suite 7.6 (Chenomx Inc Edmonton, AB, Canadá).

6.2.4. Análise dos metabólitos

Previamente à análise dos metabólitos no sangue, filtros 3kDa (Amicon Ultra) foram lavados com o intuito de obter o branco amostral, significando o glicerol total foi eliminado do soro. Para tal, foram utilizados 500 µL de H₂O Milli-Q aplicados ao filtro, com posterior centrifugação a 14.000 rpm, durante 10 min em temperatura de 4°C. Esse processo foi repetido cinco. 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 H₂O 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 min a 4°C. Após a centrifugação, foram recuperados 300 µL do soro filtrado. Ao soro foram

então adicionados 60 μL de um tampão fosfato ($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, potencial hidrogeniônico de 7,4) contendo $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de TMSP e $240 \mu\text{l}$ de H_2O Milli-Q num tubo de RMN de 5 mm para análise.

6.2.5. Determinação do erro técnico da medida de metabolômica

Considerando que a técnica é sensível à estímulos diversos, para minimizar eventuais erros da medida, evitar metabólitos com grandes variações e má condução das análises/interpretação dos resultados, alguns procedimentos foram realizados previamente às análises estatísticas. Portanto, as análises de erro técnico da medida e CV, foram conduzidas com os dados obtidos nos momentos pré do EIAI (em AmbFil e AmbPol) e do ECBI (em AmbFil e AmbPol). O erro técnico da medida foi calculado individualmente, assim como proposto (HOPKINS, 2000) e aplicado em um estudo com exercício e metabolômica (CASTRO et al., 2019). Em seguida o CV foi calculado para cada metabólito no momento pré EIAI e pré ECBI. Apesar de não haver um consenso sobre qual é a CV que deve ser adotado para os dados de metabolômica, usou-se o mesmo padrão de Castro et. al (2019), para análise apenas os metabólitos com CV inferior a 25% foram considerados.

6.2.6. Análises estatísticas

As análises estatísticas seguiram as recomendações previamente estabelecidas para dados de metabolômica (WESTERHUIS et al., 2008; XIA et al., 2013a, 2015), o que também tem sido aplicado para estudos que consideraram poluição atmosférica saúde (MILLER et al., 2015, 2016) e uma abordagem metabolômica para avaliação do metabolismo após EFA (GHOSH et al., 2013; PARRY et al., 2018).

Os dados foram ajustados em *fold change*, ou seja, a razão entre os momentos 10 min após / pré e também, 1 hora após / pré. Adicionalmente, procedeu com uma transformação logarítmica para aproximar os dados de uma distribuição de Gauss. As análises multivariadas foram baseadas em *Principal Component Analysis* (PCA) para descrever e resumir os perfis metabolômicos obtidos após cada exercício. Posteriormente, procedeu-se com *Partial Least Square – Discriminant Analysis* (PLS-DA) para identificação de quais metabólitos podem discriminar as condições AmbPol e AmbFil após exercício. Os metabólitos com *variable importance in the projection* (VIP) superior a 1,0 foram considerados como discriminantes. Os valores de *fold-change* foram apresentados como média e DP, a comparação entre os metabólitos em cada ambiente foi feita por teste T pareado. A validação das análises de metabolômica foram feitas por: i. Análise do coeficiente de determinação - R^2 ; ii. Avaliação da

capacidade do preditiva do modelo (Q^2 , considerando válido os modelos com ($Q^2 > 0,40$). Quando necessário ($Q^2 < 0,40$) a validação das análises de PLS-DA foram feitas pelos cálculos do teste de permutação para avaliar a reprodutibilidade do modelo e *Area under the curve* (AUC) para testar a acurácia na discriminação dos grupos. Para classificar os valores de AUC procedeu-se com a seguinte recomendação: 0,9–1,0 = excelente; 0,8–0,9 = bom; 0,7–0,8 = suficiente; 0,6–0,7 = pobre e 0,5–0,6 = ruim (XIA et al., 2013a).

Na segunda etapa das análises, os metabólitos VIPs ($> 1,0$) foram utilizados para identificar quais vias metabólicas eram afetadas na comparação entre AmbPol e AmbFil. Assim, uma análise de enriquecimento (*enrichment analysis*) foi conduzida comparando os ambientes nos momentos 10 min após e 1 hora após, para cada exercício. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$, além disso, e o valor da taxa de falsa descoberta (TFD) estabelecido foi $TFD < 0,20$.

O banco de dados online *The Human Metabolome Database* (<http://www.hmdb.ca/>) e *Small Molecule Pathway Database* (<http://smpdb.ca/>) foram utilizados para auxiliar na interpretação e discussão referente as vias metabólicas e os metabólitos pertencentes à elas (JEWISON et al., 2013; WISHART et al., 2012). Todas as análises de metabolômica foram realizadas no *software online* e gratuito Metaboanalyst 4.0® (<http://www.metaboanalyst.ca/>) (CHONG et al., 2018; XIA et al., 2009). A comparação das concentrações de poluentes foi realizada por meio de teste não pareado. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

6.3. Resultados

6.3.1. Concentração dos poluentes

Assim como reportado no estudo 1 a concentração de todos os poluentes foi maior para o AmbPol quando comparado com o AmbFil (figura 7).

Figura 7 - Concentração dos poluentes nas sessões experimentais. EIAI. Exercício intervalado de alta intensidade. ECBI. Exercício contínuo de baixa intensidade. AmbFil. Ambiente com ar filtrado. AmbPol. Ambiente com ar poluído. MP_{2,5}: Material particulado 2,5µm. MP₁₀: Material particulado 10 µm. NO: Óxido nítrico. NO₂: Dióxido de nitrogênio. **p < 0,01 Comparação entre ambientes poluído e com ar filtrado.

Para as variáveis temperatura ($t_{(13)} = 1,85$; $p = 0,09$; $TE = 0,69$) e umidade relativa do ar ($t_{(13)} = 0,59$; $p = 0,57$; $TE = 0,20$), não houve diferença durante as sessões de EIAI. O mesmo resultado foi observado durante o ECBI para temperatura ($t_{(13)} = -1,06$; $p = 0,31$; $TE = 0,35$) e umidade Relativa do ar ($t_{(13)} = 1,40$, $p = 0,18$; $TE = 0,31$).

Tabela 6 - Temperatura e umidade relativa do ar (UR).

		AmbFil	AmbPol
EIAI	Temperatura (°C)	20,77 ± 1,34	21,56 ± 0,95
	UR (%)	63,29 ± 8,19	64,67 ± 5,16
ECBI	Temperatura (°C)	20,79 ± 1,06	20,36 ± 1,35
	UR (%)	64,29 ± 5,40	65,93 ± 5,15

Dados são Média ± DP. EIAI. Exercício intervalado de alta intensidade. ECBI. Exercício contínuo de baixa intensidade. AmbFil. Ambiente com ar filtrado. AmbPol. Ambiente com ar poluído.

6.3.2. Análises exploratória da metabolômica e vias metabólicas

Um total de 71 metabólitos foram quantificados (mais informações no Anexo III). A partir das análises multivariadas objetivou-se identificar os metabólitos responsáveis por discriminar os perfis metabolômicos dos AmbFil e AmbPol, após EIAI e ECBI nos momentos 10 min após e 1 hora após exercício. Nesse sentido, para o EIAI, as análises multivariadas indicaram que 18 e 13 metabólitos foram importantes ($VIP > 1,0$) para discriminar os ambientes com ar filtrado e poluído, 10 min e 1 hora após, respectivamente. Para o ECBI foram

identificados 14 e 13 metabólitos com $VIP\ score > 1,0$; nos momentos 10 min e 1 hora após, respectivamente. Para a segunda etapa das análises, foram identificadas 3 (10 min após) e 2 (1 hora após) vias após EIAI de alta intensidade, para o ECBI foram identificadas 1 (10 min após) e 2 (1 hora após).

6.3.3. Exercício intervalado de alta intensidade

As análises multivariadas referentes ao EIAI são apresentadas na figura 8. A coluna da esquerda apresenta os resultados 10 min após, e a coluna da direita 1 hora após. De acordo com as análises de PCA (análise não supervisionada), a variação explicada em cada um dos grupos foi de aproximadamente 27%. Visando discriminar os grupos (AmbFil *vs* AmbPol), as análises de PLS-DA indicam por inspeção visual a separação entre os perfis metabolômicos, sendo que é possível identificar maior separação 1 hora após. Os testes de validação indicaram que apesar dos altos valores de $R^2 = 0,90$ (10 min após) e $0,91$ (1 hora após), a capacidade preditiva do modelo foi “*overfitted*” ($Q^2 < 0,4$). Contudo, após análises mais robustas de biomarcadores, o modelo foi validado. Os valores referentes aos testes de permutação foram $p < 0,01$ e $p < 0,05$ nos momentos 10 min e 1 hora após respectivamente. Adicionalmente, aos valores observados para AUC foram superiores 0,90; assim, o modelo pode ser considerado excelente.

Figura 8 - Análises multivariadas para o exercício intervalado de alta intensidade. PCA. *Principal Component Analysis*. PLS-DA. *Partial Least Square – Discriminant Analysis* AUC. *Area under the curve*.

Os metabólitos selecionados pela análise exploratória inicial, para o EIAI no momento 10 min após, estão apresentados na tabela 7. Para o AmbFil os metabólitos *Acetone* e *Carnitine* diminuíram (*Fold change* < 1,0), em contrapartida, no AmbPol aumentaram (*Fold change* > 1,0).

Tabela 7 - Metabólitos do exercício intervalado de alta intensidade – 10 min após.

Metabólito	VIP	AmbFil	AmbPol	p
<i>1-3-Dihydroxyacetone</i>	3,67	1,36 ± 0,81 (0,92 - 1,79)	0,72 ± 0,44 (0,49 - 0,96)	0,04
<i>2-Hydroxyvalerate</i>	1,94	1,40 ± 0,69 (1,03 - 1,77)	2,04 ± 1,78 (1,08 - 2,99)	0,37
<i>3-Hydroxyisovalerate</i>	1,91	1,00 ± 0,67 (0,63 - 1,36)	1,74 ± 1,65 (0,85 - 2,62)	0,41
<i>3-Methyl-2-oxovalerate</i>	1,15	1,71 ± 0,49 (1,45 - 1,97)	2,24 ± 0,77 (1,83 - 2,65)	0,03
<i>3-Methylhistidine</i>	1,04	1,03 ± 0,37 (0,83 - 1,23)	1,90 ± 2,11 (0,77 - 3,03)	0,46
<i>Acetone</i>	1,75	0,78 ± 0,33 (0,60 - 0,95)	1,15 ± 0,43 (0,92 - 1,38)	0,02
<i>Anserine</i>	1,03	0,86 ± 0,88 (0,39 - 1,33)	1,16 ± 0,99 (0,63 - 1,69)	0,42
<i>Butanone</i>	1,25	0,93 ± 0,68 (0,57 - 1,30)	0,97 ± 0,39 (0,76 - 1,18)	0,55
<i>Carnitine</i>	1,39	0,79 ± 0,25 (0,66 - 0,92)	1,06 ± 0,33 (0,89 - 1,24)	0,02
<i>Galactitol</i>	1,11	1,43 ± 1,52 (0,61 - 2,24)	2,22 ± 2,00 (1,15 - 3,29)	0,33
<i>Lysine</i>	1,74	0,82 ± 0,31 (0,65 - 0,98)	1,00 ± 0,45 (0,75 - 1,24)	0,22
<i>Mannose</i>	1,14	1,21 ± 0,49 (0,95 - 1,47)	0,97 ± 0,59 (0,66 - 1,28)	0,01
<i>N-Acetylserotonin</i>	2,42	2,18 ± 1,82 (1,21 - 3,15)	1,82 ± 2,15 (0,67 - 2,97)	0,28
<i>O-Phosphocholine</i>	1,03	0,79 ± 0,48 (0,54 - 1,05)	1,06 ± 0,77 (0,65 - 1,47)	0,41
<i>Oxypurinol</i>	1,33	6,86 ± 4,32 (4,54 - 9,17)	5,52 ± 4,27 (3,23 - 7,80)	0,24
<i>Thymine</i>	2,49	0,69 ± 0,44 (0,46 - 0,93)	1,29 ± 0,82 (0,85 - 1,73)	0,03
<i>Trimethylamine N-oxide</i>	1,03	1,21 ± 0,46 (0,97 - 1,46)	0,93 ± 0,19 (0,82 - 1,03)	0,08
<i>Valerate</i>	3,17	1,53 ± 1,13 (2,44 - 1,27)	1,86 ± 1,10 (1,27 - 2,44)	0,53

Os dados são Média ± DP (IC 95%). VIP. *Variable importance in projection*. AmbFil. Ambiente com ar filtrado. AmbPol. Ambiente com ar poluído. p. Valor de p referente a comparação entre ambientes.

Os metabólitos indicados com VIP > 1,0; 1 hora após EIAI, são apresentados na tabela 8. É interessante notar que nesse momento os metabólitos *Acetone* e *Uridine* também tiveram respostas opostas após EIAI em AmbFil e AmbPol. Para o AmbFil ambos diminuía, e para o AmbPol aumentaram.

Tabela 8 – Metabólitos do exercício intervalado de alta intensidade – 1 hora após (Continua).

Metabólito	VIP	AmbFil	AmbPol	p
<i>2-Hydroxyisobutyrate</i>	3,67	1,51 ± 1,08 (0,93 - 2,08)	1,07 ± 0,37 (0,87 - 1,27)	0,39
<i>3-Hydroxyisovalerate</i>	1,94	1,03 ± 0,48 (0,77 - 1,29)	1,28 ± 1,28 (0,59 - 1,96)	0,82
<i>3-Methyl-2-oxovalerate</i>	1,91	1,20 ± 0,43 (0,96 - 1,43)	1,55 ± 0,52 (1,27 - 1,82)	0,08

Tabela 8 - Metabólitos do exercício intervalado de alta intensidade – 1 hora após (Conclusão).

Metabólito	VIP	AmbFil	AmbPol	p
<i>3-Methylxanthine</i>	1,15	0,68 ± 0,41 (0,45 - 0,9)	1,43 ± 0,93 (0,93 - 1,92)	0,02
<i>Acetone</i>	1,04	0,75 ± 0,27 (0,61 - 0,9)	1,26 ± 0,57 (0,95 - 1,56)	0,01
<i>Galactitol</i>	1,75	1,15 ± 1,52 (0,34 - 1,96)	1,92 ± 1,64 (1,04 - 2,80)	0,06
<i>Hypoxanthine</i>	1,03	3,99 ± 2,69 (2,55 - 5,43)	2,63 ± 1,53 (1,81 - 3,45)	0,13
<i>Lysine</i>	1,25	0,80 ± 0,28 (0,64 - 0,95)	0,94 ± 0,22 (0,82 - 1,05)	0,43
<i>Malonate</i>	1,39	1,03 ± 0,49 (0,77 - 1,29)	0,76 ± 0,31 (0,59 - 0,92)	0,16
<i>O-Phosphocholine</i>	1,11	0,96 ± 0,61 (0,63 - 1,29)	2,14 ± 3,64 (0,19 - 4,09)	0,56
<i>Oxypurinol</i>	1,74	3,40 ± 1,68 (2,50 - 4,30)	2,40 ± 1,57 (1,56 - 3,24)	0,07
<i>Succinylacetone</i>	1,14	0,75 ± 0,35 (0,57 - 0,94)	1,12 ± 0,49 (0,86 - 1,39)	0,05
<i>Uridine</i>	2,42	0,90 ± 0,66 (0,53 - 1,25)	1,67 ± 0,66 (1,32 - 2,02)	0,01

Os dados são Média ± DP (IC 95%). VIP. *Variable importance in projection*. AmbFil. Ambiente com ar filtrado. AmbPol. Ambiente com ar poluído. p. Valor de p referente a comparação entre ambientes.

6.3.4. Exercício contínuo de baixa intensidade

Os resultados das análises exploratórias do ECBI são apresentados na figura 9. De acordo com as análises de PCA (supervisionada), a variância explicada em cada um dos grupos foi de aproximadamente 35 e 36%, nos momentos 10 min e 1 hora após, respectivamente. Via inspeção visual das figuras de PLS-DA, é possível verificar a discriminação entre os ambientes nos dois momentos. Os testes de validação indicaram, novamente, altos valores de $R^2 = 0,85$ (10 min após) e 0,76 (1 hora após), entretanto, a capacidade preditiva do modelo foi “*overfitted*” ($Q^2 < 0,4$). Então, procedeu-se com as análises de permutação e AUC. Assim, os valores obtidos foram considerados satisfatórios para validação do modelo nos momentos 10 min (testes de permutação: $p < 0,05$) e 1 hora após (testes de permutação: $p < 0,05$). Além disso, os valores de AUC observados foram classificados como bons (AUC: 0,86 e 0,88).

Figura 9 - Análises multivariadas para o exercício contínuo de baixa intensidade. PCA. *Principal Component Analysis*. PLS-DA. *Partial Least Square – Discriminant Analysis*. AUC. *Area under the curve*.

Os metabólitos com $VIP > 1,0$, referentes ao ECBI 10 min após, são apresentados na tabela 9. É possível perceber que o metabólito *Inosine* alterou pouco após ECBI em AmbFil, e houve aumento após exercício em AmbPol.

Tabela 9 - Metabólitos do exercício contínuo de baixa intensidade – 10 min após.

Metabólito	VIP	AmbFil	AmbPol	p
<i>2-Hydroxyvalerate</i>	2,32	1,03 ± 0,70 (0,66 - 1,41)	1,28 ± 0,65 (0,93 - 1,62)	0,15
<i>3-Hydroxybutyrate</i>	1,16	3,72 ± 3,43 (1,89 - 5,56)	5,68 ± 4,97 (3,02 - 8,33)	0,38
<i>3-Hydroxyisovalerate</i>	1,35	1,10 ± 0,61 (0,78 - 1,43)	1,07 ± 0,58 (0,76 - 1,38)	0,91
<i>Butanone</i>	2,34	1,12 ± 0,36 (0,93 - 1,31)	0,89 ± 0,50 (0,62 - 1,15)	0,12
<i>Inosine</i>	1,28	1,06 ± 0,72 (0,67 - 1,44)	1,40 ± 0,51 (1,12 - 1,67)	0,04
<i>N-Acetylserotonin</i>	3,46	1,10 ± 0,74 (0,70 - 1,49)	1,23 ± 1,49 (0,43 - 2,03)	0,27
<i>Oxypurinol</i>	1,66	1,58 ± 2,40 (0,29 - 2,86)	1,56 ± 0,67 (1,20 - 1,92)	0,17
<i>Ribose</i>	1,44	1,06 ± 0,41 (0,84 - 1,28)	1,08 ± 0,29 (0,93 - 1,24)	0,95
<i>Thymine</i>	3,10	1,11 ± 0,70 (0,73 - 1,48)	1,21 ± 0,63 (0,88 - 1,55)	1,00
<i>Trimethylamine N-oxide</i>	2,00	1,12 ± 0,34 (0,94 - 1,30)	0,92 ± 0,32 (0,75 - 1,09)	0,34
<i>Uridine</i>	4,24	0,94 ± 1,00 (0,40 - 1,47)	1,03 ± 0,73 (0,65 - 1,42)	0,46

Os dados são Média ± DP (IC 95%). VIP. *Variable importance in projection*. AmbFil. Ambiente com ar filtrado. AmbPol. Ambiente com ar poluído. p. Valor de p referente a comparação entre ambientes.

Analisando os metabólitos indicados com VIP > 1,0, no momento 1 hora após (tabela 10), é possível perceber que os metabólitos *Acetate*, *Malonate* e *Uridine* tiveram direções opostas para AmbFil e AmbPol. Sendo que, em AmbFil foram observados valores menores após exercício (*fold change* < 1,0), e para AmbPol, valores maiores.

Tabela 10 - Metabólitos do exercício contínuo de baixa intensidade – 1 hora após (Continua).

Metabólito	VIP	AmbFil	AmbPol	p
<i>1-3-Dihydroxyacetone</i>	1,24	1,57 ± 1,60 (0,71 - 2,42)	0,92 ± 0,61 (0,60 - 1,25)	0,18
<i>1-3-Dimethylurate</i>	1,28	0,95 ± 0,25 (0,81 - 1,08)	0,94 ± 0,43 (0,71 - 1,17)	0,40
<i>2-Hydroxyvalerate</i>	1,32	1,16 ± 0,80 (0,74 - 1,59)	1,29 ± 0,83 (0,85 - 1,74)	0,82
<i>3-Hydroxyisovalerate</i>	1,57	1,02 ± 0,20 (0,92 - 1,13)	0,90 ± 0,42 (0,68 - 1,13)	0,23
<i>Acetate</i>	1,06	0,93 ± 0,43 (0,70 - 1,16)	1,34 ± 0,76 (0,93 - 1,74)	0,06
<i>Anserine</i>	1,50	1,35 ± 1,90 (0,33 - 2,36)	1,62 ± 1,26 (0,95 - 2,29)	0,11
<i>Galactitol</i>	2,52	1,56 ± 1,60 (0,70 - 2,41)	1,11 ± 1,51 (0,31 - 1,92)	0,36
<i>Guanidoacetate</i>	1,17	0,92 ± 0,49 (0,66 - 1,18)	0,82 ± 0,29 (0,67 - 0,98)	0,95
<i>Malonate</i>	1,10	0,88 ± 0,56 (0,58 - 1,18)	1,16 ± 0,47 (0,91 - 1,41)	0,07
<i>Methylguanidine</i>	1,21	0,92 ± 0,48 (0,66 - 1,18)	0,87 ± 0,49 (0,61 - 1,14)	0,93

Tabela 10 - Metabólitos do exercício contínuo de baixa intensidade – 1 hora após (Conclusão).

Metabólito	VIP	AmbFil	AmbPol	p
<i>Ribose</i>	1,11	1,14 ± 0,51 (0,86 - 1,41)	1,08 ± 0,25 (0,95 - 1,21)	0,91
<i>Thymine</i>	1,61	1,03 ± 0,46 (0,79 - 1,28)	0,90 ± 0,49 (0,63 - 1,16)	0,65
<i>Uridine</i>	4,54	0,74 ± 0,60 (0,42 - 1,06)	1,26 ± 0,60 (0,94 - 1,58)	0,03
<i>Valerate</i>	4,32	1,41 ± 1,00 (0,87 - 1,94)	0,92 ± 0,82 (0,48 - 1,36)	0,19

Os dados são Média ± DP (IC 95%). VIP. *Variable importance in projection*. AmbFil. Ambiente com ar filtrado. AmbPol. Ambiente com ar poluído. p. Valor de p referente a comparação entre ambientes.

6.3.5. Vias metabólicas afetadas pela poluição atmosférica

Os resultados para as análises de enriquecimento, com o objetivo de identificar as principais vias metabólicas afetadas pela poluição atmosférica são apresentadas na figura 10. Todas as vias com $p < 0,05$ e TFD $< 0,20$ foram consideradas. A via relacionada ao metabolismo de corpos cetônicos foi indicada como afetada pela condição ambiental nos momentos 10 min e 1 hora após do EIAI.

Figura 10 – Análise de enriquecimento para cada exercício nos momentos 10 min e 1 hora após.

6.4. Discussão

Os resultados estudo 2 sugerem que quando o EIAI é realizado em AmbPol, há incompleto metabolismo de lipídios e elevada atividade do metabolismo de corpos cetônicos. Além disso, quando o ECBI é realizado em AmbPol também há incompleto metabolismo de lipídios, entretanto; sem a produção de corpos cetônicos. Coletivamente esses achados sugerem que a poluição da cidade de São Paulo altera vias metabólicas relacionados com balanço energético após os dois tipos de EFA. Do nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a utilizar a técnica analítica da metabolômica, bem como a abordagem metodológica baseada na exposição real (ambiente urbano) para avaliar os possíveis efeitos da poluição atmosférica para as vias metabólicas após realização de EIAI e ECBI.

6.4.1. Análises exploratória da metabolômica e vias metabólicas

Em razão da inexistência de um método padrão ouro para as análises estatísticas dos dados de metabolômica, na presente tese duas etapas foram adotadas: i. Análises exploratórias baseadas em estatística multivariada (“*non target*¹⁰”), ou seja, as análises não foram baseadas em metabólitos específicos. ii. Análise não exploratória (“*target*¹¹”), indicando metabólitos específicos para determinação das principais vias metabólicas afetadas após a realização de EIAI e ECBI em exposição à poluição atmosférica. Estudos prévios sobre EFA aeróbio, desempenho ou saúde utilizaram os mesmos padrões. Por exemplo, as análises variadas PCA e PLS-DA foram utilizadas para discriminar o perfil metabolômico de atletas após período de treinamento de força (YAN et al., 2009) e também os efeitos do exercício aeróbio contínuo para o perfil metabolômico (MUHSEN ALI et al., 2016).

Por outro lado, também já foi utilizada estatística univariada (ANOVA) para determinar as diferenças metabolômicas após 75 km de teste contrarrelógio em bicicleta (NIEMAN et al., 2014), análise da ingestão de alimentos durante o mesmo teste contrarrelógio (NIEMAN et al., 2012) e também após período de intensificação do treinamento aeróbio (NIEMAN et al., 2013). A principal crítica ao uso da análise univariada está centrada no fato de examinar os metabólitos separadamente e não considerar a interação entre eles (XIA et al., 2009, 2013a). Portanto, em estudos de natureza exploratória, é interessante que as análises multivariadas sejam utilizadas. Para a segunda etapa da análise estatística do presente projeto, foram conduzidas análises de

¹⁰ Os metabólitos não são escolhidos previamente.

¹¹ Os metabólitos são previamente selecionados.

enriquecimento. Optou-se por essa análise para evitar má interpretação dos dados individuais dos metabólitos e também para entender como todos eles interagem frente à um estímulo externo. É interessante notar que a análise tem sido utilizada em estudos recentes (CASTRO et al., 2019; DUFT et al., 2017) e principalmente no único estudo considerou a análise de metabolômica após exposição à poluição atmosférica durante exercício (MILLER et al., 2016).

6.4.2. Exercício intervalado de alta intensidade

Nossos resultados indicaram que a via metabólica degradação de Valina, Leucina e Isoleucina foi afetada 10 min após EIAI. Sendo que o metabólito representativo dessa via foi o *3-methyl-2-oxovalerate* (também conhecido como *ketoisoleucine*). Esse é um importante metabólito para a degradação de Valina, Leucina e Isoleucina, em especial porque é um precursor de Acetil Coenzima – A (Acetil CoA) e tem característica glicogênica e cetogênica (HOLEČEK, 2018). Foi demonstrado previamente que o exercício de alta intensidade promove o aumento na concentração sanguínea da *ketoisoleucine* devido ao aumento da demanda energética proporcionada pela atividade (HOLEČEK, 2018). Porém, nossos resultados apontam que o aumento foi maior em AmbPol. Pode-se inferir então que a poluição atmosférica tende a causar maior demanda metabólica durante o exercício. Nós especulamos que devido à disfunção endotelial e vasoconstrição causada pelos poluentes, em especial MP_{2,5} (BROOK et al., 2009, 2010), há redução na oxigenação da musculatura ativa, explicando assim, a maior atividade da via degradação de Valina, Leucina e Isoleucina (RUNDELL et al., 2015).

Nós observamos também que o metabolismo de lipídios foi afetado pelo AmbPol, com o aumento das concentrações de *carnitine* nesse ambiente, o que vai de encontro com o resultado descrito por Miller et al. (2016) para o mesmo metabólito. A *carnitine* é essencial para o metabolismo de lipídios, pois atua como facilitadora/transportadora de ácidos graxos da membrana externa da mitocôndria para as reações de β -oxidação (MILLER et al., 2016). Apesar das concentrações desse metabólito terem diminuído no estudo acima citado, outros metabólitos, que atuam de maneira conjugada com a *carnitine*, também foram aumentados, explicando assim a menor concentração após exposição para o estudo de Miller et al. (2016). Portanto, do ponto de vista de atividade da via metabólica, os resultados estão alinhados.

Nesse sentido, os achados do presente estudo também demonstram que o metabolismo de corpos cetônicos realmente foi maior após EIAI em AmbPol (aumento nas concentrações de *acetone*). Em conjunto, os resultados observados previamente e em especial no nosso estudo, indicam que i. A produção de Acetil CoA foi maior do que o ciclo de Krebs poderia “processar” (saturação da β -oxidação) e ii. Diante disso, houve acelerada produção de corpos cetônicos.

Adicionalmente, a maior produção de corpos cetônicos pode também indicar estresse oxidativo, um resultado que foi amplamente reportado em estudos sobre exposição à poluição atmosférica (COX; CLARKE, 2014; CUTRUFELLO; SMOLIGA; RUNDELL, 2012; GILES et al., 2018; GILES; KOEHLE, 2014). Outro ponto que deve ser destacado é que, embora nosso estudo não tenha sido desenhado para descrever os mecanismos, a alta produção de corpos cetônicos também está associada a diabetes mellitus do tipo 2 (MAHENDRAN et al., 2013).

Os resultados observados 1 hora após EIAI indicaram que o metabolismo de Pirimidina também foi afetado pelo AmbPol, sendo que, houve maior concentração do metabólito *uridine*, nesse ambiente. A *uridine* tem sido associada com maiores valores de pressão arterial após exercício (DUDZINSKA et al., 2015; DUDZINSKA; LUBKOWSKA, 2018). Também tem sido indicado um efeito cíclico no qual espécies reativas de oxigênio (EROs) estimulam o metabolismo de Pirimidina, e a exposição à poluentes causam a produção EROs (DEMETRIOU et al., 2012). Então, acredita-se que devido ao aumento considerável da VE e também maiores poluentes inalados durante o EIAI em AmbPol, houve maior produção de EROs e estímulo ao metabolismo de Pirimidina. Além disso, outro aspecto de saúde indica que elevados níveis de *uridine* no sangue estão relacionados com diabetes mellitus do tipo 2 e hipertensão (YANG; VIJAYAKUMAR; KAHN, 2018).

Assim como no momento 10 min após, o metabolismo de corpos cetônicos foi maior 1 hora após em AmbPol. É interessante notar que, devido à adaptações evolutivas, os corpos cetônicos podem ter papel de fonte energética, por exemplo durante longos períodos de privação alimentícia e ainda; podem indicar alguma disfunção metabólica e estresse energético (COX; CLARKE, 2014). Considerando que os participantes padronizaram a dieta previamente aos testes e eram saudáveis, nós assumimos que o AmbPol gerou o estresse energético. Esse resultado também foi encontrado previamente em estudo com animais (MILLER et al., 2015) e humanos (MILLER et al., 2016). Apesar do mecanismo pelo qual a poluição atmosférica pode gerar o estresse energético não estar completamente elucidado, acredita-se que a inflamação sistêmica, o estresse oxidativo e a acentuada ação simpática são os potenciais mecanismos de influência (BROOK et al., 2009; CUTRUFELLO; SMOLIGA; RUNDELL, 2012; FIORDELISI et al., 2017; GILES; KOEHLE, 2014; GIORGINI et al., 2016). Com relação à atividade simpática, tem sido sugerido que nervos sensoriais do sistema respiratório, chamadas de fibras vagais do tipo C são estimuladas pelos poluentes, e como efeito cascata, esses sensores nervosos agem com gatilho para resposta genérica ao estresse, produzida pelo sistema nervoso central (FIORDELISI et al., 2017; MILLER et al., 2016; SNOW et al., 2018).

Em síntese, nossos achados acerca das vias metabólicas afetadas após EIAI em AmbPol sugerem que: i. O metabolismo de lipídios é alterado, pela saturação da β -oxidação; ii. Com isso, há acentuada produção de corpos cetônicos frente ao agente estressor (poluição) e também; iii. Há maior concentração de metabólitos que funcionam como resposta ao estresse (*uridine*).

6.4.3. Exercício contínuo de baixa intensidade

As análises de enriquecimento indicaram que, 10 min após ECBI em AmbPol, o metabolismo de Purina (metabólito *inosine*) foi a principal via metabólica afetada pela poluição atmosférica. O metabolismo de Purina está relacionado com o fornecimento de energia durante o exercício, entretanto, somente quando há limitado fornecimento de oxigênio (condição de hipóxia) (KOO; SETHI, 2018; LAHIRI et al., 2007; POHJANEN et al., 2007). Considerando que a intensidade do exercício foi baixa (40% do VO_2max), o fornecimento de energia, predominantemente aeróbio e oriundo do metabolismo de lipídios, supostamente não deveria ser um problema. Então, sugere-se que o metabolismo de lipídios não foi suficiente para fornecimento de energia durante a tarefa, assim o metabolismo de Purina foi mais acentuado para compensar o fornecimento e restaurar o balanço energético (KOO; SETHI, 2018), sem necessariamente ativar o metabolismo de corpos cetônicos, como ocorreu no EIAI.

A *inosine* é um metabólito intermediário da conversão de adenosina monofosfato em ácido úrico (YANG; VIJAYAKUMAR; KAHN, 2018). O ácido úrico está associado a doenças cardiovasculares, mas considerando que apenas um metabólito intermediário de toda via metabólica foi indicado pelo modelo de análises, sugerimos cautela ao interpretar esses resultados. Também poderia ser interessante investigar mais sobre os possíveis mecanismos acerca do metabólito *inosine* e as respostas cardiovasculares após exercício em AmbPol.

Considerando o momento 1 hora após ECBI, a via metabólica relacionada com a biossíntese de lipídios também foi impactada pelo AmbPol, com os metabólitos *malonate* e *acetate*. O *acetate* é um precursor de grupos acetil, fundamentais para o metabolismo de lipídios. Então, parece que de forma análoga ao momento 10 min após, fontes alternativas de suprimento de energia foram utilizadas. Sugere-se que isso tenha ocorrido porque a via clássica de metabolismo de lipídios não foi suficiente para suprir a demanda energética da tarefa em AmbPol. Esse resultado foi encontrado também por Miller et al (2016), os autores sugeriram que uma possível explicação para o achado seria saturação da β -oxidação. Contudo, diante desses resultados esperávamos também que a produção de corpos cetônicos fosse acentuada, o que não ocorreu. Talvez a produção de *inosine* tenha “compensado” o estresse energético, evitando assim, a produção de corpos cetônicos.

Outra via metabólica afetada foi o metabolismo de Pirimidina, assim como 1 hora após EIAI. É interessante notar que essa via metabólica está associada ao estresse cardiovascular (DUDZINSKA; LUBKOWSKA, 2018). Nesse sentido, nossos resultados sugerem que na primeira hora de recuperação após ambos EFA, a recuperação é impactada. Entretanto, para o ECBI não há acentuada produção de corpos cetônicos, como no caso do EIAI. Especulamos que a intensidade do exercício possa explicar essas variações. Durante o EIAI a VE e o volume total de ar inalado foram maiores (estudo 1), então, mais mecanismos de defesa foram superados (maiores valores de VE) e mais poluentes inalados. Em conjunto, esses fatores sugerem que o EFA com menor intensidade, como no caso do ECBI, pode ser menos estressante para o organismo. De qualquer forma, sugerimos cautela ao extrapolar esses resultados. Uma saída atraente seria conduzir as análises de metabolômica com para metabólitos previamente especificados (*“tagert analysis”*), e assim refutar (ou não) nossos achados iniciais.

6.5. Conclusão

Após EIAI as principais vias metabólicas afetadas pela poluição atmosférica da cidade de São Paulo foram do metabolismo de lipídios e corpos cetônicos. Para o ECBI, o metabolismo de lipídios também foi afetado, contudo, sem a produção de corpos cetônicos. Assim, recomendamos que o EFA seja evitado quando há elevadas concentrações de poluentes no ambiente, mas se houver a prática, o ECBI pode gerar menos malefícios de forma aguda do que o EIAI.

7. LIMITAÇÕES

Os resultados apresentados nessa tese de doutorado permitem avanços importantes no entendimento sobre a interface EFA e poluição atmosférica. Todavia, algumas limitações devem ser indicadas:

- a. O volume total de poluentes inalados não foi equalizado para o EIAI e ECBI. Assim, a discussão dos dados foi baseada no fato do maior volume total inalado no exercício contínuo (como demonstrado no estudo 1) e na teoria de que as maiores taxas de VE também promovem maior exposição aos poluentes. Essa limitação também está presente em estudos prévios com o mesmo tema, assim, assumiu-se que a teoria relacionada a VE é efetiva para aumentar a exposição aos poluentes.
- b. Apesar dos resultados estarem centrados na intensidade do exercício, é preciso cautela ao extrapolar os nossos achados, baseados exclusivamente, nessa variável. Isso ocorreu porque a característica dos EFA escolhidos foram distintas (intervalado e contínuo). É importante destacar que se escolhêssemos por estudar apenas o exercício contínuo, os voluntários não conseguiriam realizá-lo na intensidade relativa à 100% do $VO_{2m\acute{a}x}$ por 20 minutos. Sendo que, foi demonstrado previamente que nessa faixa de intensidade, a duração do exercício seria aproximadamente 5 min (CHIDNOK et al., 2012).
- c. O maior volume inalado aparentemente gera maiores danos à saúde. Nesse sentido, duas questões metodológicas precisam ser indicadas no tratamento dos dados. i. Optou-se por estabelecer as diferenças cardiorrespiratórias em um estudo prévio, e depois conduzir as análises do estudo principal separando o EIAI do ECBI. ii. Para o estudo 2, as diferenças foram comparadas sem considerar o “efeito do tempo”. Procedeu-se dessa maneira para evitar possíveis interferências do exercício para a análise dos dados, pois como demonstrado previamente, o fator exercício pode suprimir ou mascarar os resultados oriundos da exposição aos poluentes (GILES et al., 2014; GILES; CARLSTEN; KOEHLE, 2012; GILES; KOEHLE, 2014).
- d. Os nossos voluntários são familiarizados com o ambiente da cidade de São Paulo, portanto, não sabemos se há adaptações do ambiente que levam a resultados menos pronunciados após EFA em AmbPol. Adicionalmente, eles não são a população que está mais suscetível aos efeitos negativos da poluição atmosférica. Em conjunto, esses fatores podem ter dificultado alguns achados, por exemplo, das citocinas pró inflamatórias após ECBI.
- e. Ainda sobre as citocinas, houve elevada variação dos valores. Porém, é importante destacar que essa é uma característica da medida. Por exemplo, já foi demonstrado que

peças expostas à poluição atmosférica, em média apresentam valores de IL-6 próximos à $3 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e a amplitude da medida é de aproximadamente 0,95 a 61,4 (RÜCKERL et al., 2007). Outro fator limitante é que as citocinas têm uma resposta lenta, assim, os resultados 10 min após podem ser mascarados. Considerando esse fator, adicionamos mais um momento para coleta de sangue (1 hora após).

- f. Não consideramos no nosso estudo os possíveis efeitos do AmbFil durante o repouso. Primeiro porque entendemos que esse seria o objetivo de outro estudo, e segundo porque além do tempo total de coletas, o projeto ao final seria mais oneroso. E ainda, com o corpo de conhecimento disponível hoje, não sabemos qual deveria ser o período de “*wash-out*” para as variáveis analisadas na presente tese.
- g. A quantidade de poluentes inalados, de maneira direta, não foi medida. As inferências acerca do volume total inalado foram feitas baseadas nas concentrações dos poluentes presentes no contêiner de exposição. Então, quando houve maiores concentrações de poluentes, assumiu-se que mais poluentes foram inalados.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Diante dos resultados e das limitações da presente tese de doutorado, como considerações finais têm-se que a prática de EIAI em ambiente com poluição atmosférica inibe o efeito hipotensor do exercício 10 min após a tarefa, há maior concentração de uma IL pró inflamatória e inibição de uma IL anti-inflamatória 1 hora após. Do ponto de vista do metabolismo, a prática de EIAI em AmbPol leva à alteração no metabolismo de lipídios e acentuada produção de corpos cetônicos.

Algumas perspectivas para novos estudos podem ser também propostas, a partir dos resultados observados nesse trabalho.

- a. Ser fisicamente ativo ou sedentário em ambientes com altas concentrações de poluentes? Apesar do nosso estudo ter sido desenhado apenas para respostas agudas, alguns resultados podem dar indícios de que ser fisicamente ativo é mais aconselhável do que ser sedentário. Isso porque, a longo prazo, os benefícios do exercício podem suprimir os malefícios da poluição. Estudos com animais (TOLEDO et al., 2012) e humanos (BOS et al., 2013) já têm sugerido isso, mas ainda são necessárias mais evidências para estabelecer essa relação de causa vs efeito.
- b. É preciso testar se a VE realmente é importante ou apenas o volume total inalado. Estudos futuros podem tentar identificar se as maiores taxas de VE realmente são um problema. Para tal, o volume total de ar inalado deve ser o mesmo em tarefas com diferentes taxas de VE.
- c. Outras populações também precisam ser consideradas, no presente estudo apenas homens saudáveis participaram. Novas pesquisas podem considerar crianças, mulheres e idosos, todos indicados como mais afetados pela poluição atmosférica.
- d. Considerando que o AmbPol provocou alterações em citocinas pró- e anti-inflamatórias, bem como no metabolismo de lipídios, novas pesquisas podem ser conduzidas com a suplementação de alimentos que tenham caráter anti-inflamatório.

REFERÊNCIAS

- AUSTIN, E. et al. Laboratory evaluation of the Shinyei PPD42NS low-cost particulate matter sensor. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0137789, 2015.
- AVOL, E. L. et al. Comparative Respiratory Effects of Ozone and Ambient Oxidant Pollution Exposure During Heavy Exercise. **Journal of the Air Pollution Control Association**, v. 34, n. 8, p. 804–809, ago. 1984.
- BAI, Y.; SUN, Q. Fine particulate matter air pollution and atherosclerosis: mechanistic insights. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1860, n. 12, p. 2863–2868, dez. 2016.
- BAYEVA, M.; SAWICKI, K. T.; ARDEHALI, H. Taking diabetes to heart—deregulation of myocardial lipid metabolism in diabetic cardiomyopathy. **Journal of the American Heart Association**, v. 2, n. 6, p. e000433, 2013.
- BERNSTEIN, J. A. et al. Health effects of air pollution. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 5, p. 1116–1123, 2004.
- BILLAT, L. V. Interval training for performance: a scientific and empirical practice. **Sports Medicine**, v. 31, n. 1, p. 13–31, 2001.
- BILLAT, V. L. et al. Interval training at VO₂max: effects on aerobic performance and overtraining markers. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 31, n. 1, p. 156–163, 1999.
- BOS, I. et al. Subclinical effects of aerobic training in urban environment. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 45, n. 3, p. 439–47, mar. 2013.
- BOS, I. et al. Physical activity, air pollution and the brain. **Sports Medicine**, v. 44, n. 11, p. 1505–1518, nov. 2014.
- BOUHUYS, A.; BECK, G. J.; SCHOENBERG, J. B. Do present levels of air pollution outdoors affect respiratory health? **Nature**, v. 276, n. 5687, p. 466, 1978.
- BOURDREL, T. et al. Effets cardiovasculaires de la pollution de l'air. **Archives of Cardiovascular Diseases**, v. 110, n. 11, p. 634–642, 2017.
- BOUTCHER, Y. N.; BOUTCHER, S. H. Exercise intensity and hypertension: what's new? **Journal of human hypertension**, v. 31, n. 3, p. 157, 2017.
- BROOK, R. D. et al. Insights into the mechanisms and mediators of the effects of air pollution exposure on blood pressure and vascular function in healthy humans. **Hypertension**, v. 54, n. 3, p. 659–667, 2009.
- BROOK, R. D. et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the american heart association. **Circulation**, v. 121, n. 21, p. 2331–

2378, 2010.

BROWER, J. B. et al. Metabolomic changes in murine serum following inhalation exposure to gasoline and diesel engine emissions. **Inhalation Toxicology**, v. 28, n. 5, p. 241–250, 2016.

BUCHHEIT, M.; LAURSEN, P. B. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle: Part I: Cardiopulmonary emphasis. **Sports Medicine**, v. 43, n. 5, p. 313–338, 2013a.

BUCHHEIT, M.; LAURSEN, P. B. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle: Part II: Anaerobic energy, neuromuscular load and practical applications. **Sports Medicine**, v. 43, n. 10, p. 927–954, 2013b.

BUTALIA, S. et al. Environmental Risk Factors and Type 1 Diabetes: Past, Present, and Future. **Canadian Journal of Diabetes**, 2016.

CARTER, J. R.; RAY, C. A. Sympathetic neural adaptations to exercise training in humans. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 188, p. 36–43, 2015.

CASTRO, A. et al. Association of skeletal muscle and serum metabolites with maximum power output gains in response to continuous endurance or high-intensity interval training programs: The TIMES study – A randomized controlled trial. **Plos One**, v. 14, n. 2, p. e0212115, 2019.

CETESB. **Caracterização das Estações da Rede Automática de Monitoramento da Qualidade do Ar na RMSP-Estação Cerqueira César**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 18 ago. 2008.

CHEN, R. et al. Fine particulate air pollution and the expression of micrornas and circulating cytokines relevant to inflammation, coagulation, and vasoconstriction. **Environmental Health Perspectives (Online)**, v. 126, n. 1, 2018.

CHIDNOK, W. et al. Exercise tolerance in intermittent cycling: application of the critical power concept. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 44, n. 5, p. 966–976, 2012.

CHONG, J. et al. MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W486–W494, 2018.

CORNELISSEN, V. A. et al. Effects of aerobic training intensity on resting, exercise and post-exercise blood pressure, heart rate and heart-rate variability. **Journal of Human Hypertension**, v. 24, n. 3, p. 175–182, 2010.

COX, P. J.; CLARKE, K. Acute nutritional ketosis: Implications for exercise performance and metabolism. **Extreme Physiology and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2014.

COZZA, I. C. et al. An approach to using heart rate monitoring to estimate the ventilation and load of air pollution exposure. **The Science of the total environment**, v. 520, p. 160–7, 1 jul. 2015.

- CUTRUFELLO, P. T.; SMOLIGA, J. M.; RUNDELL, K. W. Small Things Make a Big Difference. **Sports medicine**, v. 42, n. 12, p. 1041–1058, 2012.
- D’ALESSANDRO, A. et al. Clinical metabolomics: the next stage of clinical biochemistry. **Blood transfusion = Trasfusione del sangue**, v. 10 Suppl 2, n. May, 2012.
- DE PAULA VIEIRA, R. et al. Anti-inflammatory effects of aerobic exercise in mice exposed to air pollution. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 44, n. 7, p. 1227–1234, 2012.
- DE SOUZA, D. C. et al. Effects of high-intensity interval and moderate-intensity continuous exercise on inflammatory, leptin, IgA, and lipid peroxidation responses in obese males. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–9, 2018.
- DEMETRIOU, C. A. et al. Biomarkers of ambient air pollution and lung cancer : a systematic review. v. 21, p. 619–627, 2012.
- DOCKERY, D. W. et al. An association between air pollution and mortality in six US cities. **New England journal of medicine**, v. 329, n. 24, p. 1753–1759, 1993.
- DORNELES, G. P. et al. High intensity interval exercise decreases IL-8 and enhances the immunomodulatory cytokine interleukin-10 in lean and overweight-obese individuals. **Cytokine**, v. 77, p. 1–9, 2016.
- DRINKWATER, B. L. et al. Air Pollution, Exercise, and Heat Stress. **Archives of Environmental Health: An International Journal**, v. 28, n. 4, p. 177–181, abr. 1974.
- DUDZINSKA, W. et al. Uridine - An indicator of post-exercise uric acid concentration and blood pressure. **Physiological Research**, v. 64, n. 4, p. 467–477, 2015.
- DUDZINSKA, W.; LUBKOWSKA, M. S. A. Comparison of human erythrocyte purine nucleotide metabolism and blood purine and pyrimidine degradation product concentrations before and after acute exercise in trained and sedentary subjects. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 68, n. 3, p. 293–305, 2018.
- DUFT, R. G. et al. Metabolomics Approach in the Investigation of Metabolic Changes in Obese Men after 24 Weeks of Combined Training. **Journal of Proteome Research**, 2017.
- EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 162–184, 2013.
- EKBLOM, B. Levels of Carboxyhemoglobin. p. 474–482, 1972.
- EMWAS, A.-H. M. The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. **Metabonomics: Methods and Protocols**, p. 161–193, 2015.
- FIORDELISI, A. et al. The mechanisms of air pollution and particulate matter in cardiovascular

diseases. p. 337–347, 2017.

FIRKET, J. Fog along the Meuse valley. **Transactions of the Faraday Society**, v. 32, p. 1192–1196, 1936.

FOGELHOLM, M. et al. International physical activity questionnaire: validity against fitness. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 38, n. 4, p. 753–760, 2006.

GAME, A. B.; BELL, G. J. The effect of a competitive season and environmental factors on pulmonary function and aerobic power in varsity hockey players. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 31, n. 2, p. 95–100, 2006.

GARBER, C. E. et al. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 43, n. 7, p. 1334–1359, 2011.

GHELFI, E. et al. Cardiac oxidative stress and electrophysiological changes in rats exposed to concentrated ambient particles are mediated by TRP-dependent pulmonary reflexes. **Toxicological Sciences**, v. 102, n. 2, p. 328–336, 2008.

GHOSH, S. et al. Integrative pathway analysis of a genome-wide association study of $\dot{V}O_{2\max}$ response to exercise training. **Journal of Applied Physiology**, v. 115, n. 9, p. 1343–1359, 2013.

GIBALA, M. J. M. M. J. et al. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. **The Journal of physiology**, v. 590, n. 5, p. 1077–1084, 2012.

GIBALA, M. J.; MCGEE, S. L. Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: a little pain for a lot of gain? **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 36, n. 2, p. 58–63, 2008.

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, n. 10, p. 1999–2006, out. 2014.

GILES, L. V.; CARLSTEN, C.; KOEHLE, M. S. The effect of pre-exercise diesel exhaust exposure on cycling performance and cardio-respiratory variables. **Inhalation Toxicology**, v. 24, n. 12, p. 783–789, out. 2012.

GILES, L. V. et al. The effect of low and high-intensity cycling in diesel exhaust on flow-mediated dilation, circulating NO_x, endothelin-1 and blood pressure. **PloS one**, v. 13, n. 2, p. e0192419, 2018.

GILES, L. V.; CARLSTEN, C.; KOEHLE, M. S. The pulmonary and autonomic effects of high-intensity and low-intensity exercise in diesel exhaust. **Environmental Health**, v. 17, n. 1, p. 87, 13 dez. 2018.

GILES, L. V.; KOEHLE, M. S. The health effects of exercising in air pollution. **Sports**

Medicine, v. 44, n. 2, p. 223–249, fev. 2014.

GIORGINI, P. et al. Air pollution and exercise: a review of the cardiovascular implications for health care professionals. **Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention**, v. 36, n. 2, p. 84–95, 2016.

GONZALEZ, J. T. et al. Liver glycogen metabolism during and after prolonged endurance-type exercise. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 311, n. 3, p. E543–E553, 2016.

GRUZIEVA, O. et al. Exposure to traffic-related air pollution and serum inflammatory cytokines in children. **Environmental health perspectives**, v. 125, n. 6, 2017.

GUIMARAES, G. V. et al. Effects of continuous vs. interval exercise training on blood pressure and arterial stiffness in treated hypertension. **Hypertension Research**, v. 33, n. 6, p. 627, 2010.

GUIRAUD, T. et al. High-intensity interval training in cardiac rehabilitation. **Sports Medicine**, v. 42, n. 7, p. 587–605, 2012.

HAALAND, D. A et al. Is regular exercise a friend or foe of the aging immune system? A systematic review. **Clinical Journal of Sport Medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine**, v. 18, n. 6, p. 539–548, 2008.

HABERZETTL, P. et al. Exposure to fine particulate air pollution causes vascular insulin resistance by inducing pulmonary oxidative stress. **Environmental health perspectives**, v. 124, n. 12, p. 1830, 2016.

HALLIWILL, J. R. Mechanisms and clinical implications of post-exercise hypotension in humans. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 29, n. 2, p. 65–70, 2001.

HALLIWILL, J. R. et al. Postexercise hypotension and sustained postexercise vasodilatation: What happens after we exercise? **Experimental Physiology**, v. 98, n. 1, p. 7–18, 2013.

HEI. **What is the current health burden from air pollution?** Disponível em: <<https://www.stateofglobalair.org/health/current>>. Acesso em: 15 jan. 2019.

HOFFMANN, E. DE; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry - Principles and Applications**. [s.l.: s.n.]. v. 29

HOLEČEK, M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. **Nutrition & metabolism**, v. 15, p. 33, 3 maio 2018.

HOLLAND, G. J. et al. Air pollution simulation and human performance. **American Journal of Public Health and the Nations Health**, v. 58, n. 9, p. 1684–1691, 1968.

HOPKINS, W. G. Measures of reliability in sports medicine and science. **Sports Medicine**, v. 30, n. 1, p. 1–15, 2000.

HURSTING, S. D. et al. Energy balance and carcinogenesis: underlying pathways and targets

- for intervention. **Current cancer drug targets**, v. 7, n. 5, p. 484–491, 2007.
- IBGE. **IBGE**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/sao-paulo/panorama>>. Acesso em: 18 dez. 2018.
- JANGHORBANI, M.; MOMENI, F.; MANSOURIAN, M. Systematic review and metaanalysis of air pollution exposure and risk of diabetes. **European Journal of Epidemiology**, v. 29, n. 4, p. 231–242, 2014.
- JEWISON, T. et al. SMPDB 2.0: big improvements to the Small Molecule Pathway Database. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D478–D484, 2013.
- KOO, P.; SETHI, J. M. Metabolic Myopathies and the Respiratory System. **Clinics in Chest Medicine**, v. 39, n. 2, p. 401–410, 2018.
- KOTIN, P.; FALK, H. L. Air pollution and its effect on health. **California medicine**, v. 82, n. 1, p. 19, 1955.
- 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, n. 5, p. 548–57, maio 2015.
- KUEHNBAUM, N. L. et al. Personalized metabolomics for predicting glucose tolerance changes in sedentary women after high-intensity interval training. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–12, 2014.
- LAHIRI, S. et al. Purines , the carotid body and respiration. v. 157, p. 123–129, 2007.
- LAURSEN, P. B. Training for intense exercise performance: High-intensity or high-volume training? **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 20, n. SUPPL. 2, p. 1–10, 2010.
- LAURSEN, P. B.; JENKINS, D. G. The scientific basis for high-intensity interval training. **Sports Medicine**, v. 32, n. 1, p. 53–73, 2002.
- LAVE, L. B.; SESKIN, E. P. Air Pollution and Human Health. **Science**, v. 169, n. 3947, p. 723–733, 1970.
- LEWIS, G. D. et al. Metabolic signatures of exercise in human plasma. **Science translational medicine**, v. 2, n. 33, p. 33ra37–33ra37, 2010.
- LUCAS, J. A Brief History of Modern Trends in Marathon Training. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 301, n. 1, p. 858–861, 1977.
- LUCHT, S. et al. Air pollution and diabetes-related biomarkers in non-diabetic adults: A pathway to impaired glucose metabolism? **Environment International**, v. 124, p. 370–392, 2019.
- MAHENDRAN, Y. et al. Association of Ketone Body Levels With Hyperglycemia and Type

- 2 Diabetes in 9,398 Finnish Men. **Diabetes**, v. 62, n. 10, p. 3618 LP-3626, 1 out. 2013.
- MÄKIKALLIO, T. H. et al. Abnormalities in beat to beat complexity of heart rate dynamics in patients with a previous myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 28, n. 4, p. 1005–1011, 1996.
- MATTEDI, M. A.; BUTZKE, I. C. A relação entre o social e o natural nas abordagens de hazards e de desastres. **Ambiente & Sociedade**, v. 4, n. 9, p. 1–22, 2001.
- MILANOVIĆ, Z.; SPORIŠ, G.; WESTON, M. Effectiveness of high-intensity interval training (HIT) and continuous endurance training for VO₂max improvements: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. **Sports medicine**, v. 45, n. 10, p. 1469–1481, 2015.
- MILLER, D. B. et al. Inhaled ozone (O₃)-induces changes in serum metabolomic and liver transcriptomic profiles in rats. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 286, n. 2, p. 65–79, 2015.
- MILLER, D. B. et al. Ozone exposure increases circulating stress hormones and lipid metabolites in humans. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 193, n. 12, p. 1382–1391, 2016.
- MILLS, N. L. et al. Adverse cardiovascular effects of air pollution. **Nature clinical practice. Cardiovascular medicine**, v. 6, n. 1, p. 36–44, jan. 2009.
- MONLEON, D. et al. Metabolomic analysis of long-term spontaneous exercise in mice suggests increased lipolysis and altered glucose metabolism when animals are at rest. **Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 10, p. 1110–1119, 2014.
- MUHSEN ALI, A. et al. Metabolomic Profiling of Submaximal Exercise at a Standardised Relative Intensity in Healthy Adults. **Metabolites**, v. 6, n. 1, p. 1–16, 2016.
- MUOIO, D. M.; KOVES, T. R. **Lipid-induced metabolic dysfunction in skeletal muscle**. Novartis Found Symposium. **Anais...**2008
- NEMERY, B.; HOET, P. H. M.; NEMMAR, A. The Meuse Valley fog of 1930: An air pollution disaster. **Lancet**, v. 357, n. 9257, p. 704–708, 2001.
- NICHOLSON, J. K.; BUCKINGHAM, M. J.; SADLER, P. J. High resolution ¹H n.m.r. studies of vertebrate blood and plasma. **The Biochemical journal**, v. 211, n. 3, p. 605–15, 1983.
- NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Systems biology: Metabonomics. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1054–1056, 23 out. 2008.
- NICHOLSON, J. K.; WILSON, I. D. Understanding ‘ Global ’ Systems Biology : Metabonomics and the Continuum of Metabolism. v. 2, n. August, p. 411–420, 2003.
- NIEMAN, D. C. et al. Bananas as an energy source during exercise: A metabolomics approach. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37479, 2012.

- 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, n. 10, p. 4577–4584, 2013.
- 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, n. 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, n. 12, p. 5367–5377, 2015.
- NIINIMAA, V. et al. The switching point from nasal to oronasal breathing. **Respiration physiology**, v. 42, n. 1, p. 61–71, 1980.
- NRIAGU, J. O. A history of global metal pollution. **Science**, v. 272, n. 5259, p. 223, 1996.
- 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, p. 821–831, 2014.
- OMS. WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. 2005.
- LOUDIN, A.; FORSBERG, B.; JAKOBSSON, K. Air pollution and stroke. **Epidemiology**, v. 23, n. 3, p. 505–506, 2012.
- PAN, Z.; RAFTERY, D. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 2, p. 525–527, 2007.
- 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, n. 5, p. 327–336, 2015.
- PARRY, T. L. et al. Untargeted metabolomics analysis of ischemia–reperfusion-injured hearts ex vivo from sedentary and exercise-trained rats. **Metabolomics**, v. 14, n. 1, p. 1–15, 2018.
- PASQUA, L. A. **Poluição atmosférica e exercício aeróbio: efeitos da duração e intensidade sobre o sistema cardiorrespiratório, perfil inflamatório e metabóloma**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 30 out. 2017.
- PEAKE, J. M. et al. Metabolic and hormonal responses to isoenergetic high-intensity interval exercise and continuous moderate-intensity exercise. **American journal of physiology Endocrinology and metabolism**, n. 307, p. E539–E552, 2014.
- PEDERSEN, B. K. Muscles and their myokines. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 2, p. 337–346, 2011.
- PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived

- interleukin-6. **Physiological reviews**, v. 88, n. 4, p. 1379–1406, 2008.
- PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 8, p. 457, 2012.
- PIERSON, W. E. et al. Implications of air pollution effects on athletic performance. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 18, n. 3, p. 322–327, 1986.
- PIERSON, W. E. Impact of Air Pollutants on Athletic Performance. n. c, 1989.
- PIRNAY, F. et al. Muscular exercise during intoxication by carbon monoxide. **Journal of Applied Physiology**, v. 31, n. 4, p. 573–575, 1971.
- POHJANEN, E. et al. A multivariate screening strategy for investigating metabolic effects of strenuous physical exercise in human serum. **Journal of proteome research**, v. 6, n. 6, p. 2113–2120, 2007.
- PUBMED. **Air pollution and health.** Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>>. Acesso em: 17 abr. 2017.
- RAJAGOPALAN, S.; BROOK, R. D. Air Pollution and Type 2 Diabetes Mechanistic Insights. v. 61, n. December, p. 3037–3045, 2012.
- RIBEIRO, A. G. et al. Incidence and mortality for respiratory cancer and traffic-related air pollution in São Paulo, Brazil. **Environmental research**, v. 170, p. 243–251, 2019.
- ROBERGS, R. A.; GHIASVAND, F.; PARKER, D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 3, p. R502–R516, 2004.
- ROJAS-RUEDA, D. et al. Health Impacts of Active Transportation in Europe. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0149990, jan. 2016.
- RÜCKERL, R. et al. Air pollution and inflammation (interleukin-6, C-reactive protein, fibrinogen) in myocardial infarction survivors. **Environmental health perspectives**, v. 115, n. 7, p. 1072–1080, 2007.
- RUNDELL, K. W. et al. Air quality and temperature effects on exercise-induced bronchoconstriction. **Compr Physiol**, v. 5, n. 2, p. 579–610, 2015.
- SABATINE, M. S. et al. Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia. **Circulation**, v. 112, n. 25, p. 3868–3875, 2005.
- SAMET, J. M. et al. Fine particulate air pollution and mortality in 20 US cities, 1987–1994. **New England journal of medicine**, v. 343, n. 24, p. 1742–1749, 2000.
- SCHOPENHAUER, A. **A arte de escrever**. [s.l.] L&PM, 2005.
- SEATON, A. et al. Particulate air pollution and acute health effects. **The lancet**, v. 345, n. 8943, p. 176–178, 1995.

- SEILER, S.; TØNNESEN, E. Intervals , Thresholds , and Long Slow Distance : the Role of Intensity and Duration in Endurance Training. **Training**, v. 13, n. 13, p. 32–53, 2009.
- SEPPÄNEN, A. Physical work capacity in relations to carbon monoxide inhalation and tobacco smoking. **Annals of clinical research**, v. 9, n. 5, p. 269–274, 1977.
- SILVA JÚNIOR, R. S. DA; OLIVEIRA, M. G. L. DE; ANDRADE, M. DE F. Weekend/weekday differences in concentrations of ozone, nox, and non-methane hydrocarbon in the metropolitan area of São Paulo. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 24, n. 1, p. 100–110, 2009.
- SMITH-RYAN, A. E. et al. Effects of high-intensity interval training on cardiometabolic risk factors in overweight/obese women. **Journal of sports sciences**, v. 0414, n. March, p. 1–9, 2016.
- SMITH, L. Inhalation of the photochemical smog compound peroxyacetyl nitrate. **American Journal of Public Health and the Nations Health**, 1965.
- SMITH, T. P.; COOMBES, J. S.; GERAGHTY, D. P. Optimising high-intensity treadmill training using the running speed at maximal O₂ uptake and the time for which this can be maintained. **European journal of applied physiology**, v. 89, n. 3–4, p. 337–343, 2003.
- SMITH, T. P.; MCNAUGHTON, L. R.; MARSHALL, K. J. Effects of 4-wk training using V_{max}/T_{max} on VO₂max and performance in athletes. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 31, n. 6, p. 892–896, 1999.
- SNOW, S. J. et al. Neuroendocrine Regulation of Air Pollution Health Effects : Emerging Insights. v. 164, n. 1, p. 9–20, 2018.
- STERGIOU, G. S. et al. Validation of the Microlife BPA100 Plus device for self-home blood pressure measurement according to the International Protocol. **Blood pressure monitoring**, v. 11, n. 3, p. 157–160, 2006.
- STOKINGER, H. E.; WAGNER, W. D.; WRIGHT, P. G. **Studies of ozone toxicity I Potentiating effects of exercise and tolerance developmentArchives of Environmental and Occupational Health**, 1956.
- SUN, Q. et al. Ambient air pollution exaggerates adipose inflammation and insulin resistance in a 702 mouse model of diet-induced obesity. **Circulation**, v. 119, p. 538–546, 2009.
- SVENSSON, D. The International Journal of the History of Sport How Much Sport is there in Sport Physiology ? Practice and Ideas in the Stockholm School of Physiology at GCI , 1941 – 1969 in the Stockholm School of Physiology at GCI , 1941 – 1969. **The International Journal of the History of Sport**, v. 3367, n. March, p. 37–41, 2016.
- TALANIAN, J. L. et al. Two weeks of high-intensity aerobic interval training increases the

- capacity for fat oxidation during exercise in women. **Journal of applied physiology**, v. 102, n. 4, p. 1439–1447, 2007.
- TOLEDO, A C. et al. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. **The European respiratory journal**, v. 39, n. 2, p. 254–64, fev. 2012.
- VAN VELDHOFEN, K. et al. Impact of short-term traffic-related air pollution on the metabolome—Results from two metabolome-wide experimental studies. **Environment international**, v. 123, p. 124–131, 2019.
- VETTENNIEMI, E. Why Did the ‘Flying Finns’ Walk? A Footnote to the History of Athletics Training. **International Journal of the History of Sport**, v. 29, n. 7, p. 1060–1079, 2012.
- WAYNE, W. S.; WEHRLE, P. F.; CARROLL, R. E. Oxidant air pollution and athletic performance. **JAMA**, v. 199, n. 12, p. 901–904, 1967.
- WEICHENTHAL, S. et al. Traffic-related air pollution and acute changes in heart rate variability and respiratory function in urban cyclists. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 10, p. 1373–1378, 2011.
- WESTERHUIS, J. A. et al. Assessment of PLS-DA cross validation. **Metabolomics**, v. 4, n. 1, p. 81–89, 2008.
- WESTON, M. et al. Effects of low-volume high-intensity interval training (HIT) on fitness in adults: A meta-analysis of controlled and non-controlled trials. **Sports Medicine**, v. 44, n. 7, p. 1005–1017, 2014.
- WEWEGE, M. et al. The effects of high-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous training on body composition in overweight and obese adults: a systematic review and meta-analysis. **Obesity Reviews**, v. 18, n. 6, p. 635–646, 2017.
- WHO. **Global Urban Ambient Air Pollution Database (update 2016)**. Disponível em: <http://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair/databases/cities/en/>. Acesso em: 23 set. 2016.
- WILKINS, E. T. Air pollution aspects of the London fog of December 1952. **Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society**, v. 80, n. 344, p. 267–271, 1954.
- WISHART, D. S. et al. HMDB 3.0—the human metabolome database in 2013. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D801–D807, 2012.
- WOLF, K. et al. Association Between Long-Term Exposure to Air Pollution and Biomarkers Related to Insulin Resistance, Subclinical Inflammation and Adipokines. **Diabetes**, v. 65, n. November, p. db151567, 2016.
- XIA, J. et al. MetaboAnalyst: A web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 2, p. 652–660, 2009.

- XIA, J. et al. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: An introductory tutorial. **Metabolomics**, v. 9, n. 2, p. 280–299, 2013a.
- XIA, J. et al. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W251–W257, 2015.
- XIA, T. et al. Cobenefits of replacing car trips with alternative transportation: a review of evidence and methodological issues. **Journal of environmental and public health**, v. 2013, 2013b.
- YAN, B. et al. Metabolomic investigation into variation of endogenous metabolites in professional athletes subject to strength-endurance training. **Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 2, p. 531–538, 2009.
- YANG, Q.; VIJAYAKUMAR, A.; KAHN, B. B. Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, p. 1, 2018.
- ZÉ, T. **São São Paulo**. São Paulo. Gravador Rozenblit., , 1968.
- ZHANG, K.; BATTERMAN, S. Air pollution and health risks due to vehicle traffic. **Science of the total Environment**, v. 450, p. 307–316, 2013.
- ZHENG, X. et al. HHS Public Access. **Anal Chem.**, v. 25, n. 4, p. 368–379, 2015.
- ŽITNIK, M. et al. Exercise-induced effects on a gym atmosphere. **Indoor air**, v. 26, n. 3, p. 468–77, jun. 2016.
- ZUURBIER, M. et al. Minute ventilation of cyclists, car and bus passengers: an experimental study. **Environmental Health**, v. 8, n. 1, p. 48, 2009.

ANEXOS**ANEXO I. Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa com humanos**

USP - ESCOLA DE EDUCAÇÃO
FÍSICA E ESPORTE DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Exercício intervalado de alta intensidade e poluição atmosférica: análise dos efeitos agudos sobre o sistema cardiovascular, inflamação sistêmica e perfil metabólico

Pesquisador: Rômulo Cássio de Moraes Bertuzzi

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 88410218.2.0000.5391

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.979.728

Apresentação do Projeto:

O projeto pretende avaliar o estresse cardiovascular, a inflamação sistêmica, o perfil metabólico e a percepção de esforço durante o exercício predominantemente aeróbico frente a ambiente poluído e não poluído. O estudo será desenvolvido em indivíduos saudáveis, fisicamente ativos e sem histórico de doenças. As atividades serão divididas em sessões em cicloergômetro com alta ou média intensidade e expostos ou não a ambiente poluído.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a resposta do perfil metabólico, estresse cardiovascular, inflamação sistêmica e percepção de esforço de exercícios predominantemente aeróbio em ambientes poluído e não poluído

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos neste estudo são baixos, visto que será coletado sangue antes e após as sessões de treinamento.

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

Existe pequena possibilidade de desconforto em função do teste de esforço máximo ou à exposição a ambiente poluído.

Como benefícios, os voluntários terão total acesso aos seus dados, podendo ser gerado um relatório informando valores de consumo máximo de oxigênio, frequência cardíaca máxima, e intensidades dos limiares ventilatórios. Esses dados podem ser usados como indicativo de saúde cardiopulmonar, e poderão ser utilizados, por exemplo, em programas de treinamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo procura aumentar o conhecimento sobre os efeitos da poluição sobre o sistema cardiovascular e o perfil inflamatório de indivíduos que desenvolvem atividade física. Este tema é de grande interesse e o estudo traz ótima perspectiva de aprofundar o conhecimento e possivelmente trazer melhorias aplicáveis aos programas de treinamento em grandes cidades.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão adequados

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

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_1107038.pdf	09/09/2018 21:24:33		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	ProjetoDetalhado.pdf	09/09/2018 21:18:15	Rômulo Cássio de Moraes Bertuzzi	Aceito

Página 02 de

Continuação do Parecer: 2.979.728

Investigador	ProjetoDetalhado.pdf	09/09/2018 21:18:15	Rômulo Cássio de Moraes Bertuzzi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	09/09/2018 21:17:57	Rômulo Cássio de Moraes Bertuzzi	Aceito

Folha de Rosto	folhaDeRostoAssinada.pdf	13/04/2018 15:25:15	Rômulo Cássio de Moraes Bertuzzi	Aceito
----------------	--------------------------	------------------------	-------------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 24 de Outubro de 2018

Assinado por:

Edilamar Menezes de Oliveira
(Coordenador(a))

ANEXO II. Etapas a percorrer para as análises de metabolômica

Se do ponto de vista das informações que podem ser geradas, a metabolômica é bastante atraente, a análise e o posterior tratamento dos dados também exigem cuidados compatíveis com os resultados que podem ser gerados. Por exemplo, nesse trabalho, após a coleta de sangue venoso, essa amostra será centrifugada para se obter o soro. Posteriormente, o soro será filtrado, com intuito de excluir macromoléculas da amostra (e. g. proteínas). Depois desse processo preliminar, há basicamente três procedimentos para encontrar quais metabólitos e suas respectivas concentrações estão em cada amostra, à saber, a. aquisição do espectro, b. perfilamento e c. quantificação. A aquisição (Figura 2) é realizada por meio da Ressonância Magnética Nuclear, a amostra é introduzida na máquina, sendo submetida a um campo magnético e irradiação, de maneira simplista, por meio da interação de campos magnéticos e da espectroscopia um espectro é obtido. Contudo, esse espectro não fornece ainda as informações desejadas, assim, procede-se para a fase do perfilamento.

Figura 2 - Aquisição do espectro.

O segundo passo é realizado em um programa específico, nele deverá ser feito o ajuste do espectro (como a correção da linha de base) para realizar a identificação e quantificação dos metabólitos (figura 3). Há um programa com um conjunto de ferramentas para esses ajustes, chamado Chenomix NMR Suite® v. 8.2.

Figura 3 - Procedimentos para perfilamento e ajuste do espectro

No mesmo programa é realizada a terceira e última etapa, a quantificação (figura 4). O Chenomix NMR Suite 8.2® tem uma biblioteca interna que funciona como um mapa de metabólitos, dessa maneira, ele mesmo indica quais são os picos e seus respectivos metabólitos. Todavia, são necessários ainda mais ajustes finos, para realmente identificar os picos (e seus metabólitos) e quantificar as concentrações de cada um deles, por isso, sugere-se que o mesmo avaliador faça todos os procedimentos. A quantificação de cada metabólito é baseada na área sob a curva (parte sombreado do quadro “Identificação e quantificação” da figura 3). Depois de identificar e quantificar todos os metabólitos um arquivo do tipo .xlsx é gerado, contendo todos metabólitos (colunas) e suas respectivas concentrações em cada em cada amostra (linhas).

Figura 4 - Identificação e quantificação dos metabólitos (Eixo X. Freqüência do metabólito pelo tempo de retenção. Eixo Y. Concentração do metabólito).

Depois de obter os metabólitos e suas respectivas concentrações é possível proceder com a análise estatística dos dados, no caso da metabolômica, conduzir a análise e confecção de figuras em programas destinados a esse fim. Uma possibilidade é fazer as análises no programa MetaboAnalyst 3.0®, que não exige licença para uso e está disponível em versão online. Nele (e em outros similares), as análises mais comuns para estes dados (metabolômica) podem ser feitas, baseada em análises multivariadas, como Principal Components Analysis

(PCA) e Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA). Esses métodos multivariados buscam analisar, descrever e discriminar um conjunto de metabólitos, fornecendo informações sobre perfis e quais variáveis determinam a formação desses perfis.

A análise baseada em PCA é um método não supervisionado, assim, busca-se identificar padrões de um determinado grupo de dados sem considerar um tipo ou grupo (classe), ou seja, a partir dos ajustes matemáticos é possível fazer inferências descritivas para apresentar perfis, analisar tendências e identificar outliers. De forma análoga, o PLS-DA também tem como objetivo descrever um conjunto de variáveis, porém, essa análise é classificada como supervisionada, nesse sentido, há indicação de grupos e a sua função é buscar quais metabólitos levam a diferenciação desses grupos (análise de discriminantes) (TRYGG; HOLMES e LUNDSTEDT, 2007; WORLEY e POWERS, 2015). Por fim, os metabólitos mais determinantes para discriminação de grupos a partir do PLS-DA são selecionados pelo *Variable Importance Projection* (VIP), todos os metabólitos com $VIP \geq 1,0$ são selecionados por determinarem a conformidade do cluster.

Em resumo, na mesma proporção em que os resultados obtidos a partir dessa técnica são enriquecedores para pesquisas, os procedimentos metodológicos também precisam ser percorridos com precisão. Os avanços tecnológicos dos equipamentos aos programas computacionais para análises permitem que os pesquisadores tenham segurança e fidedignidade científica para reportar e interpretar seus resultados. E apesar da riqueza de possibilidades no tocante a análise de metabólitos, há (relativamente) poucos estudos que consideraram essa técnica em pesquisas que envolvem educação física e esportes.

ANEXO III. Resumo das análises estatísticas

A estimativa do tamanho da amostra para os dados de metabolômica é apresentada abaixo. Os cálculos foram baseados em um estudo prévio (piloto), realizado com dois participantes (A: 26 anos; $\text{VO}_{2\text{max}}$: $44,5 \text{ (ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$. B: 24 anos; $\text{VO}_{2\text{max}}$: $46,5 \text{ (ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$).

Cálculo do tamanho da amostra para o estudo 2.

Informações adicionais para as variáveis analisadas durante o TIM.

Variável	Média $\pm$ DP (IC 95%)
FC_{max} (bpm)	$173,40 \pm 8,93$ (168,79 - 178,01)
Duração (min)*	$9,93 \pm 1,39$ (9,22 - 10,65)
$\text{Carga}_{\text{max}}$ (W)	$298,00 \pm 41,61$ (276,51 - 319,49)
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	$21,29 \pm 2,69$ (19,91 - 22,68)
Umidade relativa do ar (%)	$58,53 \pm 5,11$ (55,89 - 61,17)

*O aquecimento de 5 min não foi considerado para cálculo da média.

Informações adicionais para as variáveis analisadas durante o EIAI e ECBI das sessões do estudo preliminar.

	Dia 1 (média $\pm$ DP (IC95%))	Dia 2 (média $\pm$ DP (IC95%))
Carga 100% VO ₂ max (W)	298,00 $\pm$ 41,61 (276,51 - 319,49)	-
Carga 40% VO ₂ max (W)	100,00 $\pm$ 14,64 (92,44 - 107,56)	-
Duração EIAI (min)*	20,00	-
Duração ECBI (min)*	37,88 $\pm$ 3,10 (36,30 - 39,50)	
Temperatura (°C)	21,29 $\pm$ 2,69 (19,91 - 22,68)	21,01 $\pm$ 1,96 (20,00 - 22,03)
Umidade relativa do ar (%)	58,53 $\pm$ 5,11 (55,89 - 61,17)	56,57 $\pm$ 5,06 (53,96 - 59,19)
EIAI		
Ventilação (L $\cdot$ min ⁻¹)	96,75 $\pm$ 12,42 (89,87 – 103,64)	93,65 $\pm$ 11,86 (87,08 – 100,22)
Volume total inalado (L)	1873,04 $\pm$ 237,29 (1741,63 – 2004,45)	1935 $\pm$ 248,41 (1797,50 – 2072,63)
FC (bpm)	166,29 $\pm$ 9,38 (161,10 – 171,50)	163,22 $\pm$ 9,34 (158,05 – 168,40)
PAS repouso (mmHg)	124,13 $\pm$ 8,91 (119,20 – 129, 06)	127,33 $\pm$ 8,60 (122,60 – 132,10)
PAS 10-min após (mmHg)	116,20 $\pm$ 6,40 (112,65 – 119,74)	116,73 $\pm$ 8,42 (112,07 – 121,40)
PAD repouso (mmHg)	73,66 $\pm$ 7,47 (69,52 – 77,80)	72,26 $\pm$ 6,87 (68,46 – 76,07)
PAD 10-min após (mmHg)	73,00 $\pm$ 10,68 (67,09 – 78,91)	73,46 $\pm$ 6,57 (69,82 – 77,11)
ECBI		
Ventilação (L $\cdot$ min ⁻¹)	40,89 $\pm$ 5,11 (38,06 – 43,72)	41,22 $\pm$ 5,04 (38,42 – 44,01)
Volume total inalado (L)	1591,23 $\pm$ 193,43 (1484,11 – 1698,35)	1579,62 $\pm$ 208,71 (1464,04 – 1695,21)
FC (bpm)	107,54 $\pm$ 8,84 (102,64 – 112,44)	108,18 $\pm$ 10,31 (102,46 – 113,89)
PAS repouso (mmHg)	121,73 $\pm$ 8,67 (116,93 – 126,53)	121,60 $\pm$ 7,09 (117,67 – 125,52)
PAS 10-min após (mmHg)	119,86 $\pm$ 9,54 (114,58 – 125,14)	116,60 $\pm$ 9,74 (111,20 – 121,99)
PAD repouso (mmHg)	73,20 $\pm$ 6,32 (69,70 – 76,70)	74,26 $\pm$ 7,15 (70,30 – 78,29)
PAD 10-min após (mmHg)	71,86 $\pm$ 6,11 (68,48 – 75,23)	72,60 $\pm$ 6,80 (68,83 – 76,36)

Os dados são média $\pm$ DP (95% IC). *O aquecimento de 5 min não foi considerado para cálculo da média.

Informações adicionais para as variáveis analisadas durante o EIAI e ECBI das sessões do estudo principal.

	AmbFil (média $\pm$ DP (IC95%))	AmbPol (média $\pm$ DP (IC95%))
EIAI		
FC (bpm)	151,15 $\pm$ 12,30 (144,34 – 157,97)	150,00 $\pm$ 12,21 (143,20 – 156,76)
PAS repouso (mmHg)	131,20 $\pm$ 9,24 (126,08 - 136,32)	128,60 $\pm$ 7,08 (124,68 – 132,52)
PAS 10-min após (mmHg)	118,73 $\pm$ 7,64 (114,49 - 122,97)	123,53 $\pm$ 9,82 (118,09 – 128,97)
PAS 1-hora após (mmHg)	113,53 $\pm$ 9,92 (108,03 - 119,03)	120,73 $\pm$ 9,16 (115,66 – 125,80)
PAD repouso (mmHg)	80,00 $\pm$ 7,84 (75,66 - 84,34)	77,06 $\pm$ 6,05 (73,71 – 80,41)
PAD 10-min após (mmHg)	78,66 $\pm$ 6,89 (74,84 – 82,48)	79,26 $\pm$ 7,17 (75,29 – 83,24)
PAD 1-hora após (mmHg)	83,00 $\pm$ 12,05 (76,32 – 89,67)	78,73 $\pm$ 9,69 (73,36 – 84,10)
ECBI		
FC (bpm)	110,77 $\pm$ 10,95 (104,71 – 116,84)	108,16 $\pm$ 14,17 (100,31 - 116,01)
PAS repouso (mmHg)	126,40 $\pm$ 7,78 (122,09 – 130,71)	123,46 $\pm$ 10,65 (117,57 – 129,35)
PAS 10-min após (mmHg)	119,26 $\pm$ 5,13 (116,42 – 122,11)	120,93 $\pm$ 7,72 (116,65 – 125,21)
PAS 1-hora após (mmHg)	118,46 $\pm$ 7,66 (114,22 – 122,71)	122,33 $\pm$ 9,80 (116,90 – 127,76)
PAD repouso (mmHg)	78,85 $\pm$ 8,85 (73,96 – 83,77)	76,80 $\pm$ 5,30 (73,86 – 79,74)
PAD 10-min após (mmHg)	77,13 $\pm$ 6,33 (73,62 – 80,64)	78,33 $\pm$ 8,66 (73,54 – 83,12)
PAD 1-hora após (mmHg)	78,20 $\pm$ 6,49 (74,60 – 81,79)	78,73 $\pm$ 7,36 (74,65 – 82,81)

Os dados são média $\pm$ DP (95% IC).

Os poluentes medidos pela CETESB na estação Cerqueira César (Av. Doutor Arnaldo, 725, Faculdade de Saúde Pública, Sumaré, São Paulo) são apresentados na figura abaixo. Como esperado, a concentração dos poluentes foi constante durante o período de coletas, de fato, discriminando os dias em que foram realizados os testes em AmbFil e AmbPol, não houve diferença para nenhum dos indicadores de poluição atmosférica.

Dados obtidos em em: <https://cetesb.sp.gov.br/ar/qualar/>. Média entre os horários de 10:00 – 21:00 horas.

Adicionalmente, na tabela abaixo são apresentados. Os dados foram obtidos no site www.inmet.gov.br os valores para variáveis as demais variáveis ambientais. Os valores informados foram: temperatura: 22°, umidade relativa 71 do ar (%) e precipitação total (149,9 mm). (Estação: 83781 - Latitude: -23.5. Longitude: -46.61. SÃO PAULO, MIR.de SANTANA – SP).

Como descrito na metodologia do estudo 2, os dados de metabolômica demanda ajustes prévios as análises. Portanto, as figuras abaixo apresentam a normalização dos dados de metabolômica, baseado em transformação logarítmica para o EIAI, os quadros A e B representam os momentos 10 min após e 1 hora após, respectivamente.

Normalização logarítmica para os dados observados após exercício intervalado de alta intensidade nos momentos 10 min (A) e 1 hora após (B).

Normalização dos dados de metabolômica, baseado em transformação logarítmica para o ECBI, os quadros A e B representam os momentos 10 min após e 1 hora após, respectivamente.

Normalização logarítmica para os dados observados após Exercício contínuo de baixa intensidade nos momentos 10 min (A) e 1 hora após (B).

Os metabólitos identificados e quantificados nos momentos pré dos dois de EIAI e nos dois dias ECBI estão apresentados na tabela abaixo. Para a análise estatística dos dados procedeu-se como proposto por previamente para o cálculo do “erro técnico da medida”. O coeficiente de variação apresentado é a média do CV observado para EIAI e ECBI. Apesar de não haver um consenso sobre qual o valor aceitável para o CV em estudos com metabolômica, padronizou-se que nenhum metabólito com CV superior a 25% seria utilizado para as análises posteriores.

Metabólitos identificados e quantificados para posterior análise (Continua).

Metabólito	EIAI	ETM	ECBI	ETM	CV _{Geral}
<i>1-3-Dihydroxyacetone</i>	0,0018 ±0,0038	1,50	0,0013 ±0,0025	1,00	11,64 ± 3,29
<i>1-3-Dimethylurate</i>	0,0060 ±0,0016	0,31	0,0056 ±0,0018	0,52	5,55 ± 1,92
<i>2-Hydroxybutyrate</i>	0,0132 ±0,0047	0,31	0,0133 ±0,0065	0,40	5,53 ± 0,97
<i>2-Hydroxyisobutyrate</i>	0,0007 ±0,0003	0,50	0,0008 ±0,0002	0,34	3,99 ± 1,03
<i>2-Hydroxyisovalerate</i>	0,0053 ±0,0013	0,20	0,0052 ±0,0011	0,13	2,17 ± 0,57
<i>2-Hydroxyvalerate</i>	0,0108 ± 0,004	0,33	0,0117 ±0,0050	0,57	6,81 ± 2,62
<i>2-Oxoisocaproate</i>	0,0026 ±0,0007	0,32	0,0024 ±0,0006	0,20	3,02 ± 0,98
<i>3-Hydroxybutyrate</i>	0,0153 ±0,0127	1,10	0,0144 ±0,0182	1,21	17,35 ± 0,59
<i>3-Hydroxyisovalerate</i>	0,0008 ±0,0004	0,77	0,0008 ±0,0004	0,62	6,66 ± 1,08
<i>3-Methyl-2-oxovalerate</i>	0,0023 ±0,0006	0,39	0,0023 ±0,0006	0,27	3,74 ± 1,02
<i>3-Methylxanthine</i>	0,0005 ±0,0002	0,49	0,0006 ±0,0002	0,43	4,18 ± 0,32
<i>Acetate</i>	0,0247 ±0,0134	0,56	0,0265 ±0,0151	0,72	11,68 ± 2,25
<i>Acetone</i>	0,0040 ±0,0027	0,74	0,0037 ±0,0017	0,73	8,97 ± 0,10
<i>Alanine</i>	0,2544 ±0,0383	0,16	0,2526 ±0,0521	0,28	10,93 ± 3,95
<i>Anserine</i>	0,0035 ±0,0026	0,83	0,0035 ±0,0024	0,74	9,29 ± 0,77
<i>Asparagine</i>	0,0219 ±0,0044	0,21	0,0232 ±0,0047	0,26	4,32 ± 0,63
<i>Betaine</i>	0,0298 ±0,0073	0,30	0,0296 ±0,0047	0,14	4,29 ± 2,15
<i>Butanone</i>	0,0020 ±0,0040	1,05	0,0015 ±0,0014	0,71	9,14 ± 2,55
<i>Carnitine</i>	0,0232 ±0,0097	0,49	0,0225 ±0,0044	0,17	5,95 ± 4,02
<i>Choline</i>	0,0039 ±0,0012	0,29	0,0038 ±0,0011	0,34	3,93 ± 0,44
<i>Citrate</i>	0,0581 ±0,0177	0,29	0,0614 ±0,0154	0,32	7,39 ± 0,71
<i>Creatine</i>	0,0125 ±0,0160	0,96	0,0175 ±0,0311	0,98	14,63 ± 0,93
<i>Creatine phosphate</i>	0,0144 ±0,0043	0,29	0,0145 ±0,0028	0,21	4,09 ± 0,86
<i>Creatinine</i>	0,0465 ±0,0071	0,17	0,0454 ±0,0075	0,19	3,98 ± 0,34
<i>Dimethyl sulfone</i>	0,0034 ±0,0011	0,33	0,0036 ±0,0012	0,34	4,08 ± 0,08
<i>Formate</i>	0,0255 ±0,0113	0,35	0,0307 ±0,0129	0,37	6,84 ± 0,60
<i>Fumarate</i>	0,0006 ±0,0002	0,35	0,0006 ±0,0002	0,32	3,13 ± 0,23
<i>Galactitol</i>	0,0154 ±0,0077	0,86	0,0176 ±0,0068	0,95	14,69 ± 1,51
<i>Glucose</i>	2,3538 ±0,4605	0,20	2,3353 ±0,4142	0,30	20,74 ± 5,65
<i>Glutamine</i>	0,2050 ±0,0399	0,20	0,2075 ±0,0340	0,21	8,90 ±0,58
<i>Glycerol</i>	0,0783 ±0,0237	0,41	0,0779 ±0,0188	0,32	9,83 ± 1,60
<i>Glycine</i>	0,1268 ±0,0237	0,16	0,1303 ±0,0252	0,26	7,00 ± 2,36
<i>Glycolate</i>	0,0095 ±0,0024	0,24	0,0088 ±0,0022	0,19	3,19 ± 0,58

Metabólitos identificados e quantificados para posterior análise (Conclusão).

Metabólito	EIAI	ETM	ECBI	ETM	CV _{geral}
<i>Glycylproline</i>	0,0420 ±0,0103	0,28	0,0449 ±0,0114	0,31	6,46 ±0,55
<i>Guanidoacetate</i>	0,0113 ±0,0022	0,35	0,0118 ±0,0025	0,28	4,86 ±0,72
<i>Hypoxanthine</i>	0,0008 ±0,0005	0,75	0,0010 ±0,0006	0,81	7,61 ±0,51
<i>Inosine</i>	0,0028 ±0,0011	0,50	0,0031 ±0,0012	0,47	5,70 ±0,16
<i>Isobutyrate</i>	0,0048 ±0,0030	0,53	0,0044 ±0,0015	0,37	5,71 ±1,42
<i>Isoleucine</i>	0,0400 ±0,0193	0,63	0,0425 ±0,0143	0,38	10,63 ±3,52
<i>Lactate</i> [†]	0,8206 ±0,2483	0,32	0,8246 ±0,3084	0,46	108,02 ±24,64
<i>Leucine</i>	0,0721 ±0,0259	0,43	0,0750 ±0,0189	0,29	9,30 ±2,40
<i>Lysine</i>	0,0789 ±0,0304	0,42	0,0827 ±0,0213	0,31	9,95 ±1,95
<i>Malonate</i>	0,0073 ±0,0038	0,85	0,0075 ±0,0032	0,57	9,80 ±2,57
<i>Mannose</i>	0,0151 ±0,0061	0,36	0,0143 ±0,0049	0,40	6,14 ±0,44
<i>Methanol</i>	0,0575 ±0,0141	0,32	0,0606 ±0,0122	0,25	6,91 ±1,15
<i>Methionine</i>	0,0117 ±0,0050	0,78	0,0114 ±0,0052	0,37	8,75 ±4,46
<i>Methylguanidine</i>	0,0017 ±0,0011	0,81	0,0021 ±0,0013	0,59	7,50 ±1,50
<i>N-N-Dimethylglycine</i>	0,0016 ±0,0004	0,20	0,0017 ±0,0005	0,28	2,59 ±0,56
<i>N-Acetylserotonin</i>	0,0032 ±0,0025	1,01	0,0036 ±0,0028	0,90	11,10 ±0,86
<i>O-Acetylcarnitine</i>	0,0042 ±0,0012	0,28	0,0038 ±0,0012	0,42	4,30 ±1,17
<i>O-Phosphocholine</i>	0,0009 ±0,0004	0,69	0,0007 ±0,0003	0,43	5,39 ±1,98
<i>Oxypurinol</i>	0,0139 ±0,0076	0,70	0,0178 ±0,0120	0,77	11,80 ±1,01
<i>Pantothenate</i>	0,0026 ±0,0009	0,40	0,0023 ±0,0008	0,54	5,38 ±1,07
<i>Phenylalanine</i>	0,0289 ±0,0093	0,32	0,0300 ±0,0074	0,24	5,46 ±1,07
<i>Proline</i>	0,0970 ±0,0406	0,52	0,0936 ±0,0319	0,42	13,37 ±2,12
<i>Propylene glycol</i>	0,0067 ±0,0017	0,29	0,0071 ±0,0020	0,26	3,78 ±0,28
<i>Pyruvate</i>	0,0480 ±0,0182	0,34	0,0426 ±0,0190	0,64	10,53 ±4,29
<i>Ribose</i>	0,0969 ±0,0282	0,39	0,0937 ±0,0229	0,37	11,04 ±0,61
<i>Sarcosine</i>	0,0011 ±0,0003	0,29	0,0011 ±0,0004	0,27	2,85 ±0,17
<i>Succinate</i>	0,0037 ±0,0017	1,13	0,0046 ±0,0016	0,56	10,31 ±4,48
<i>Succinylacetone</i>	0,0198 ±0,0112	0,94	0,0166 ±0,0079	0,76	14,17 ±2,47
<i>Threonine</i>	0,0749 ±0,0191	0,29	0,0778 ±0,0163	0,26	7,25 ±0,39
<i>Thymine</i>	0,0014 ±0,0012	0,59	0,0011 ±0,0004	0,49	5,48 ±0,71
<i>Trimethylamine</i>	0,0009 ±0,0005	0,24	0,0010 ±0,0004	0,24	2,36 ±0,03
<i>Trimethylamine N-oxide</i>	0,0059 ±0,0120	1,10	0,0035 ±0,0026	0,48	9,69 ±5,56
<i>Tyrosine</i>	0,0400 ±0,0161	0,43	0,0392 ±0,0096	0,19	6,55 ±3,49
<i>Urea</i>	0,2866 ±0,1255	0,40	0,2895 ±0,1329	0,36	19,41 ±1,63
<i>Uridine</i>	0,0015 ±0,0009	0,46	0,0163 ±0,0558	2,01	13,52 ±12,32
<i>Valerate</i>	0,0037 ±0,0017	0,60	0,0127 ±0,0314	1,55	13,69 ±9,07
<i>Valine</i>	0,1391 ±0,0457	0,35	0,1419 ±0,0323	0,19	9,45 ±3,75
<i>3-Methylhistidine</i>	0,0025 ±0,0014	1,21	0,0024 ±0,0011	0,53	9,84 ±5,42

Os dados são média ± DP. EIAI. Exercício intervalado de alta intensidade. ECBI. Exercício contínuo de baixa intensidade. ETM. Erro técnico da medida. CV. Coeficiente de variação. [†] Metabólito desconsiderado nas análises.