



**UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA
UNIVERSIDADE REGIONAL DO NOROESTE DO
ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
ATENÇÃO INTEGRAL À SAÚDE**

**TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO À EXPOSIÇÃO AO
MATERIAL PARTICULADO FINO: ESTRESSE OXIDATIVO
CARDIOPULMONAR E CONCENTRAÇÃO DE eHSP72 EM
CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ALINE SFALCIN MAI

IJUÍ - RS, BRASIL
2016

**TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO À EXPOSIÇÃO AO
MATERIAL PARTICULADO FINO: ESTRESSE OXIDATIVO
CARDIOPULMONAR E CONCENTRAÇÃO DE eHSP72 EM
CAMUNDONGOS**

Por

ALINE SFALCIN MAI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde. Programa em rede entre a Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ, RS), e a Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Atenção Integral à Saúde**

Orientador: Prof. Dr Thiago Gomes Heck

Co-orientadora: Profa. Dra. Mirna Stela Ludwig

IJUÍ -RS, BRASIL
2016

Catálogo na Publicação

M217t Mai, Aline Sfalcin.
Treinamento físico combinado à exposição ao material particulado fino: estresse oxidativo cardiopulmonar e concentração de eHSP72 em camundongos / Aline Sfalcin Mai. – Ijuí, 2016.
94f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (Campus Ijuí). Atenção Integral à Saúde.

"Orientador: Thiago Gomes Heck."
"Co-orientadora: Mirna Stela Ludwig."

1. Proteínas de choque térmico. 2. Poluição atmosférica. 3. Coração. 4. Pulmão. 5. Exercício. I. Heck, Thiago Gomes. II. Ludwig, Mirna Stela. III. Título. IV. Título: Estresse oxidativo cardiopulmonar e concentração de eHSP72 em camundongos.

CDU: 796.015:577.112

Zeneida Britto
CRB10/1374

UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA E UNIVERSIDADE REGIONAL DO NOROESTE
DO RIO GRANDE DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM ATENÇÃO INTEGRAL
À SAÚDE

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO À EXPOSIÇÃO AO MATERIAL
PARTICULADO FINO: ESTRESSE OXIDATIVO CARDIOPULMONAR
E CONCENTRAÇÃO DE eHSP72 EM CAMUNDONGOS**

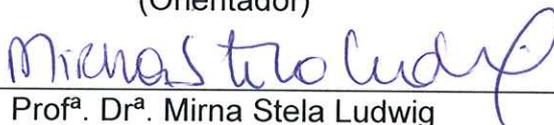
elaborada por:

ALINE SFALCIN MAI

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Atenção Integral à Saúde



Prof. Dr. Thiago Gomes Heck
(Orientador)



Profª. Drª. Mirna Stela Ludwig
(Coorientadora)

COMISSÃO EXAMINADORA



Profª. Drª. Roberta Cattaneo Horn - (UNICRUZ)



Prof. Dr. Matias Nunes Frizzo - (UNIJUI)



Prof. Dr. Ramiro Barcos Nunes - (IFSUL)

ljuí, 19 de julho de 2016

Dedico este trabalho a minha filha Maria Antônia Mai de 3 anos e dez meses. Pois realizou muitos experimentos em suas brincadeiras, durante o período que estive presente intensamente no laboratório. Como também internalizou em suas falas e atitudes inúmeras vezes: “Gordura não é saudável”, ou perguntando: “mamãe, você é uma pesquisadora?”. “Quando eu crescer, serei uma cientista, posso trabalhar com o Professor Thiago?”. Espero ter influenciado o desafio da pesquisa!

Ao João Fernando que está sendo gerado em meu ventre (32 semanas), espero ter estimulado a alegria da pesquisa com sabedoria em cada momento.

Dedico ao meu esposo Fernando Mai. Obrigada pela paciência! Eu te amo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por possibilitar a inserção no **GRUPO GPeF** e permitir que esse trabalho acontecesse.

Agradeço aos meus Pais **Edilce e Edivan Sfalcin**, pelo apoio, amor, esforço financeiro e exemplo do trabalho intenso, mesmo com dificuldades, jamais a possibilidade de desistir das escolhas realizadas.

Obrigada a minha irmã **Simone Sfalcin Toniello** e o meu cunhado **Edenilso Toniello** pelo carinho, torcida, companheirismo e entendimento durante este tempo. Ao sobrinho **Vicente Sfalcin Toniello** de 1 ano de vida, desejo que o seu caminho seja repleto bênçãos.

Agradeço o amor e carinho de toda a família **Mai**. Pelos sobrinhos, queridos, **Paulo Henrique Mai, Anderson Stenke e Flávio Mai**, pelas ajudas no período experimental do trabalho e o apoio emocional que possibilitaram. Desejo a vocês sucesso e realizações no mundo da Medicina!

Meus sinceros agradecimentos à colega querida e companheira **Analú Bender dos Santos**, com quem aprendi e aprendo muito. Obrigada pela sabedoria, paciência e o tempo dedicado, do início até o final deste trabalho. Desejo-lhe sucesso e realizações, pois terás muitos frutos para colher!

Agradeço ao meu querido orientador e amigo, **Thiago Gomes Heck** por me conceder a oportunidade de aprender com o grupo de pesquisa **GPeF**, por mostrar os valores do caminho da pesquisa. Pelo equilíbrio e sabedoria que permitiu em todos os momentos desse estudo. Pela confiança que depositastes no meu trabalho. Por tornar o Laboratório de Ensaios Biológicos um espaço de aprendizagem e convívio. Sempre estimulando/ valorizando a importância e a necessidade do trabalho coletivo.

Agradeço a minha querida professora, co-orientadora e amiga, **Mirna Stela Ludwig**, pelas vezes que me escutou, orientou e permitiu que eu continuasse caminhando. Pela sabedoria

utilizada em suas palavras. Pelo tempo que possibilitou na hora certa, no momento certo para que realmente eu pudesse internalizar o que realmente precisava absorver, nos diferentes momentos. Principalmente quando, realmente, o meu cérebro necessitava de tempo e reflexão.

Professor **Thiago Gomes Heck** e Professora **Mirna Stela Ludwig**. Eternos Professores! Obrigada por permitirem que esse caminho fosse trilhado e vivenciado intensamente na construção de conhecimentos!

Ao funcionário **Douglas** do biotério, obrigada pelo apoio e carinho do início até o final do trabalho.

Aos vigilantes da UNIJUÍ, que estiveram comigo nos finais de semana, enquanto eu realizava a instilação dos animais.

Agradeço a todos os integrantes do **Laboratório de Ensaios Biológicos; Grupo GPeF**, que estiveram comigo sempre! Obrigada pelas incansáveis ajudas, apoio, incentivo, amizades e contribuições sem às quais este trabalho não existiria. **Analú, Yohanna, Fernanda, Guilherme, Lucas, Luana, Marlon, Maicon, Renan, João, Iberê, Jéssica, Yana, Marcos, Lilian, Carolain.**

Aos meus colegas de Pós-Graduação que compartilharam desabafos neste trajeto.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Atenção Integral a Saúde, pelos ensinamentos e trabalho realizado.

A equipe do Colégio Evangélico Augusto Pestana, principalmente ao Diretor **Gustavo Malschitzky, Deizy Ritterbush Soares e Mariluz da Silva Luchese**, que possibilitaram a realização deste sonho.

As minhas colegas de trabalho do CEAP. Especialmente **Simone Sabo e Taina Gonzatto da Rosa**, pelos ânimos que diariamente nos fortalecia em nossas trocas de ideias.

A todas as pessoas, tias (os), primos, avós e dindos que possibilitaram o apoio e carinho no cuidado com a minha filha, **Maria Antônia Mai**, ao grupo denominado “**Búfalos**”, dentre eles a prima **Abigail Mai Michel**.

A minha cunhada e amiga **Lílian Denise Mai**, obrigada pelos estímulos para sempre persistir na qualificação profissional. Obrigada pelos caminhos sugeridos através das leituras realizadas no trabalho.

A amiga **Anagilda Bacarin Gobo**, que sem perceber possibilitou um novo caminho em minha formação acadêmica. Obrigada pelo carinho!

A amiga **Margareth Neumann**, que realmente me orientou sobre os desafios da língua inglesa. Obrigada pela paciência!

A todas as **pessoas, colegas, amigos e familiares** que se alegraram comigo, me ensinaram e compartilharam conhecimentos com amor e paciência. Ouviram as minhas angústias e preocupações que surgiram durante esse período. Também a todos que de alguma forma participaram na plateia durante este período.

Um abraço a todos e o meu muito obrigada!

RESUMO

A exposição ao poluente atmosférico material particulado fino (MP_{2,5}), é um risco para a saúde e um problema global cada vez mais grave. É amplamente divulgada a necessidade da prática regular de exercícios físicos. A exposição ao MP_{2,5} está relacionado ao aumento de estresse oxidativo cardiopulmonar e elevação dos níveis plasmáticos de proteínas de choque térmico de 72kDa (eHSP72), enquanto que, o treinamento físico está associado com a melhora nas defesas antioxidantes e não se conhece os efeitos sobre as eHSP72. Sabe-se que a realização de uma sessão de exercício físico exposto ao MP_{2,5} está associada com o aumento de lipoperoxidação cardiopulmonar. No entanto, as alterações nos parâmetros de estresse oxidativo cardiopulmonar e plasmáticos de eHSP72, em resposta ao treinamento regular exposto ao MP_{2,5} não são conhecidas, e podem ser dependentes da intensidade do esforço. Nesse sentido, este estudo investiga o efeito do treinamento físico de diferentes intensidades em camundongos expostos cronicamente ao MP_{2,5} quanto ao estresse oxidativo cardiopulmonar e níveis de eHSP72. **Metodologia:** Foram utilizados 32 camundongos machos, com 30 dias de idade, que foram divididos nos grupos experimentais por 12 semanas: Controle (CON), treinamento moderado (MOD, até 60 min, 4% de carga, 5x/sem), treinamento intenso (INT até 20 min, 8% de carga, 5x/sem), exposto ao MP_{2,5} (5µg de MP_{2,5} em suspensão, via intranasal, 7x/sem), treinamento moderado exposto ao MP_{2,5} (MOD+MP_{2,5}) e treinamento intenso exposto ao MP_{2,5} (INT+MP_{2,5}). O treinamento foi de natação. **Resultados:** Não houve alterações no peso dos animais, na glicemia de jejum e na resposta ao teste de tolerância a glicose (GTT). Os grupos MOD e MOD+MP_{2,5} atingiram concentrações de lactato sanguíneo próximas a 4 mmol/l os grupos INT e INT+MP_{2,5} valores maiores que 5,5 mmol/l. Nos grupos MOD+MP_{2,5} e INT+MP_{2,5} foram mensurados maiores níveis de dano oxidativo lipídico cardíaco quando comparado com MP_{2,5} (P<0,05) e o grupo MOD+MP_{2,5} maiores níveis do que o grupo MOD (P<0,05). O grupo INT+MP_{2,5} apresentou níveis de dano oxidativo lipídico pulmonar maior do que todos os demais grupos (P<0,05). No tecido pulmonar e cardíaco, não foram observadas alterações na atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD. Os níveis plasmáticos de eHSP72 não foram alterados pelo treinamento MOD ou INT em relação ao CON. A exposição crônica ao MP_{2,5} nos animais sedentários elevou os níveis plasmáticos de eHSP72 de 1,24 ng/ml (CON) para 2,78 ng/ml (MP_{2,5}), mas não nos treinados. **Conclusão:** A interação crônica entre exercício e inalação de MP_{2,5} causa estresse oxidativo cardiopulmonar, mas não modifica os níveis plasmáticos de eHSP72.

Palavras-chave: Proteínas de choque térmico, Poluição atmosférica, Coração, Pulmão, Exercício.

SUMÁRIO

RESUMO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
INTRODUÇÃO.....	12
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
Poluição atmosférica.....	14
Efeitos da inalação de material particulado fino na saúde.....	17
Estresse oxidativo e material particulado fino.....	19
Treinamento físico.....	21
Proteínas de choque térmico.....	23
OBJETIVO GERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
Local de realização	26
Animais.....	26
Delineamento experimental.....	26
Tamanho Amostral	29
Material particulado fino	29
Protocolo de Treinamento físico moderado e intenso	30
Perfil glicêmico	31
Teste de tolerância à glicose (GTT)	31
Peso corporal	32
Lactato sanguíneo	32
Preparação dos tecidos.....	32
Determinação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT.....	32
Dosagem de proteínas e lipoperoxidação	33
Análise estatística.	33
RESULTADOS	34
DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXO I – Parecer CEUA	62
ANEXO II – Artigo a ser submetido e normas da revista.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da classificação do material particulado de acordo com o tamanho aerodinâmico	16
Figura 2. Representação gráfica do efeito direto do material Particulado sobre o Estresse Oxidativo	20
Figura 3. Imagem ilustrativa da coleta de sangue para mensuração da concentração sanguínea de lactato.....	29
Figura 4. Imagem ilustrativa do Teste de Tolerância à Glicose	29
Figura 5 . Imagem Ilustrativa da instilação intranasal de MP2.5	30
Figura 6. Imagem ilustrativa do protocolo de repouso e treinamento físico de natação	31
Figura 7. Concentração de lactato sanguíneo em camundongos expostos ao material particulado fino após uma sessão de treinamento de natação periodizado.....	35
Figura 8. Resposta ao teste de tolerância a glicose de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas.....	38
Figura 9. Atividade da enzima antioxidante SOD no tecido cardíaco de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas	39
Figura 10. Atividade da enzima antioxidante CAT no tecido cardíaco de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas	39
Figura 11. Lipoperoxidação no tecido cardíaco de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas.....	41
Figura 12. Atividade da enzima antioxidante SOD no tecido pulmonar de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas	42
Figura 13. Atividade da enzima antioxidante CAT no tecido pulmonar de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas	43
Figura 14. Lipoperoxidação no tecido pulmonar de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas.....	43
Figura 15. Concentração de eHSP72 no plasma de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Padrões nacionais de qualidade do ar quanto ao material particulado	17
Tabela 2. Caracterização do protocolo experimental de treinamento de natação e exposição ao Material Particulado fino (MP _{2,5})	28
Tabela 3. Peso corporal de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas.....	36
Tabela 4. Glicemia de jejum de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas	37

LISTA DE ABREVIATURAS

MP- Material Particulado

MP_{2.5} - Material Particulado Fino

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

O₂ - Ânion superóxido

OH- Radical Hidroxila

NO- Oxigênio Nítrico

ONOO⁻ Peróxido Nítrico

H₂O₂- Peróxido de Hidrogênio

SOD- Superóxido dismutase

CAT- Catalase

TBARS- Teste de Substância ao ác. Tiobarbitúrico

GTT- teste de tolerância a glicose

OMS- Organização Mundial da Saúde

EO- Estresse oxidativo

LPO- Lipoperoxidação

eHSP72 - Proteína de Choque Térmico de 72kDa extra celular

GTT- Teste de Tolerância a Glicose

MOD- Treinamento Físico Moderado

INT- Treinamento Físico Intenso

ASC- Área sob a curva

MOD+MP_{2.5}- Treinamento Físico Moderado Exposto ao Material Particulado

INT+MP_{2.5} Treinamento Físico Intenso Exposto ao Material particulado

ROFA - Residual Oil Fly Ash

INTRODUÇÃO

Os níveis elevados de poluição atmosférica nos dias atuais atingem um dos requisitos básicos para a saúde e o bem-estar dos seres humanos, como respirar ar de qualidade. Por outro lado, a realização de exercício físico é recomendada para a promoção e manutenção da saúde. Sendo assim, a associação dos efeitos da prática regular de exercício físico concomitante a exposição à poluição atmosférica parece ser um desafio ao organismo humano, sobretudo ao sistema cardiopulmonar.

Em todo o mundo, a exposição aos diferentes tipos de poluentes atmosféricos, especialmente o poluente material particulado fino (MP_{2.5}), é um perigo para a saúde e um problema global cada vez mais grave. Isso se deve aos efeitos tóxicos, a diversidade de poluentes existentes e o grande número de pessoas expostas a esses riscos. Além de prejudicar a saúde da população e a qualidade de vida, a poluição atmosférica também resulta em altos custos para os governos. O aumento do número de atendimentos em saúde, internações hospitalares e uso de medicamentos são exemplos de despesas que poderiam ser evitadas com a melhoria da qualidade do ar (BRASIL, 2014).

Neste cenário, é amplamente divulgada a necessidade das pessoas adotarem um estilo de vida saudável. Entre outros fatores, um bom estilo de vida está relacionado com a inclusão da prática regular de atividade física e de exercício físico. Este estudo tem o intuito de ser utilizado como instrumento de avaliação dos riscos/benefícios da prática de exercícios físicos regulares (treinamento) em animais expostos ao MP_{2.5}, considerando a intensidade do exercício. Assim, a proposta deste estudo é colaborar na geração de conhecimento para compreensão da relação entre o equilíbrio metabólico e estado redox do organismo em resposta ao treinamento físico exposto à poluição atmosférica.

Dessa maneira, o organismo apresenta capacidades de responder a diferentes desafios fisiológicos quando submetidos às mudanças impostas pelo ambiente ou mesmo do próprio metabolismo que se faz necessário para a sobrevivência do mesmo. Quanto maior a intensidade do desafio imposto à homeostase, maior é a complexidade dos mecanismos desencadeados para reconstruir a homeostase. Por outro lado, temos que, alterações moderadas podem moldar as capacidades fisiológicas por meio de adaptações internas. Assim é perceptível que desafios realizados ao organismo geram estresse oxidativo e aumento expressão de eHSPs), que dependendo da intensidade pode causar efeitos danosos na saúde. Neste sentido, salientam-se os efeitos da realização de exercício físico desafiando o

organismo durante o esforço físico, mas, promovendo adaptações que podem ser benéficas diante de outras adversidades como no ambiente externo, a poluição atmosférica.

Convém salientar que, alterações em parâmetros de estresse oxidativo (pró e antioxidantes) ocorrem em situações de desafio ao organismo nas duas dimensões em estudo (exercício físico e exposição à poluição atmosférica). Assim, o efeito do exercício físico sobre a regulação metabólica e sobre o balanço das atividades pró e antioxidantes dos diferentes órgãos e sistemas, requer um estudo que indique com precisão o “ponto crítico” na prescrição de exercício, principalmente quanto à intensidade do esforço. Dessa forma, o “ponto crítico” poderia ser determinado através de parâmetros de estresse oxidativo, que normalmente são influenciados por condições inadequadas, como a exposição a níveis elevados de poluentes atmosféricos durante o esforço.

No entanto, as alterações nos parâmetros de estresse oxidativo cardiopulmonar em resposta ao esforço físico exposto ao $MP_{2,5}$ podem ser dependentes da intensidade do esforço. Assim como os níveis plasmáticos da expressão da proteína eHSP72 foram mensurados para indicar o equilíbrio entre a exposição à poluição atmosférica e o exercício físico, com o intuito de estabelecer indicativos sobre a intensidade do esforço físico no momento da prescrição de exercícios físicos desde a infância até a vida adulta.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Poluição atmosférica

A poluição atmosférica, ao longo dos últimos 250 anos, faz-se presente nos mais diferentes cenários desde a revolução industrial. Esta emissão de poluentes deixou de se restringir ao uso doméstico de combustíveis vegetais e minerais. Atualmente, aproximadamente 50% da população do planeta vive em cidades e aglomerados urbanos e está progressivamente exposta a níveis elevados de poluentes atmosféricos, gerados pela própria ação do homem (ARBEX et al., 2004).

Entende-se por poluição atmosférica a presença de substâncias estranhas na atmosfera como gases ou suspensão de partículas sólidas e líquidas, que apresentam concentrações suficientes para interferir direta ou indiretamente na saúde e bem estar dos seres humanos. Tais poluentes podem provocar uma redução na visibilidade, da intensidade luminosa, provocar odores desagradáveis e/ou gerar alterações na temperatura ambiente (CANÇADO, 2006, p. 32).

As fontes poluidoras da atmosfera são classificadas em fontes naturais ou biogênicas e fontes antropogênicas. Dentre as fontes naturais se encontram vulcões, decomposição de matéria orgânica e vegetações que liberam grandes quantidades de poeira e pólen na atmosfera (EPA, 2010). O desenvolvimento técnico-científico levou a criação de fontes antropogênicas como aquelas derivadas das indústrias, do transporte motorizado e do uso de agrotóxicos. Estas fontes podem também ser classificadas como fixas (estacionárias) ou móveis, sendo as primeiras, aquelas que ocupam uma área relativamente limitada como instalações industriais e habitacionais, e as segundas, representadas pelos meios de transporte (EPA, 2010). Além disso, de acordo com o ambiente em que os poluentes se encontram, a poluição pode ser classificada como *indoor* (poluição interna ou doméstica) ou *outdoor* (poluição externa, industrial ou fora de casa) que representa na maioria das vezes, uma situação na qual a área poluída não é a mesma em que a poluição foi gerada (HU, 2012).

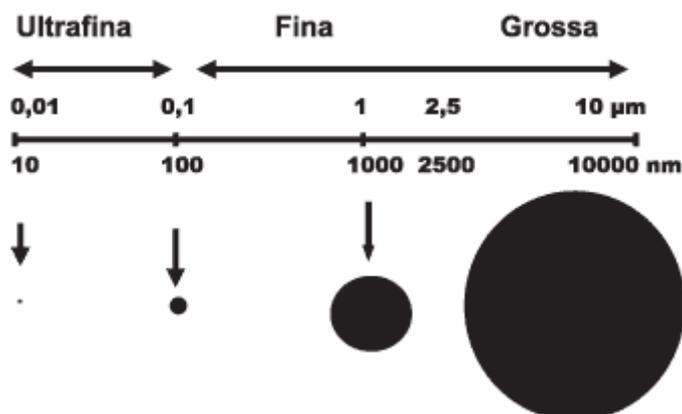
No mundo, 3,7 milhões de mortes são atribuídas à poluição atmosférica ambiental enquanto 4,3 milhões são atribuídas a fontes caseiras de poluentes atmosféricos. Aproximadamente, 200 milhões de pessoas morreram no mundo nos últimos 10 anos por doenças cardiovasculares derivadas da exposição à poluição atmosférica decorrente do uso de combustíveis sólidos, tais como madeira, resíduos oriundos das atividades agrícolas e carvão.

A produção de energia para diversas tarefas de uso doméstico, como cozinhar e aquecer casas com combustíveis sólidos como biomassa (lenha, esterco, palha e outros resíduos vegetais) ou carvão, produz altos níveis de fumaça que contêm poluentes que prejudicam a saúde, principalmente em países considerados de baixa a média condição de renda (OMS, 2012).

Produtos emitidos diretamente das fontes poluidoras são chamados de poluentes primários, como o material particulado (MP), dióxido de enxofre (SO_2), dióxido de nitrogênio (NO_2) e monóxido de carbono (CO). Já os resultantes de transformação sofridas pelos poluentes primários são poluentes secundários, como é o caso do Ozônio (O_3). O MP é o que tem recebido maior atenção no campo científico, tanto em pesquisas epidemiológicas quanto experimentais, porque apresenta em sua composição um conjunto de poluentes formados a partir de processos de combustão, mais comum nos centros urbanos, com alto potencial tóxico à saúde humana (BRASIL, 2015).

O tamanho do MP está diretamente associado ao seu potencial de causar danos à saúde, sendo que, quanto menor a partícula, maiores são os efeitos produzidos (XU et al., 2010). O MP pode ser classificado em Partículas Totais em Suspensão (PTS), que são aquelas cujo diâmetro é menor que 50 μm , e em Partículas Inaláveis, cujo diâmetro é menor que 10 μm . Estas são classificadas em partículas grossas – MP_{10} (2,5 a 10 μm), partículas finas – $\text{MP}_{2,5}$ (<2,5 μm) ou ultrafinas – $\text{MP}_{0,1}$ (<0,1 μm) (BRASIL, 2015). Nos poluentes MP_{10} e nas PTS, as fontes antropogênicas são a poeira de ruas e estradas, atividades agrícolas e de construção. Como fontes naturais, cita-se o pólen, fungos e cinzas vulcânicas. Os poluentes $\text{MP}_{2,5}$ e $\text{MP}_{0,1}$, são geralmente oriundos das fontes da queima de combustíveis fósseis, de biomassa e usinas termoelétricas. Para uma melhor visualização segue abaixo uma figura representativa referente ao tamanho das partículas:

Figura 1. Representação da classificação do material particulado de acordo com o tamanho aerodinâmico



Adaptado de Donaldson et al, 2001

Desde 1997, a Universidade de Provo nos Estados Unidos tem realizado avaliações periódicas do nível de MP na atmosfera que auxiliaram na compreensão dos efeitos da poluição atmosférica na saúde humana, verificando como as várias escalas de tempo de exposição à poluição e suas diferentes concentrações podem gerar respostas no organismo, como o desencadeamento de doenças cardiovasculares e pulmonares (POPE, 2013). O padrão americano de qualidade do ar para concentrações de MP₁₀ ficou mais rigoroso no ano de 2005, passando o limite máximo permitido para um período de 24 horas de 150 µg/m³ para 50 µg/m³ em média, e para o período de um ano de 50 µg/m³ para 20 µg/m³, em média. Se considerado o MP_{2,5}, o padrão estabelecido para concentrações deste passou de 65 µg/m³ para 25 µg/m³, durante o período de 24 horas, e de 15 µg/m³ para 10 µg/m³, durante o período de um ano (OMS, 2005).

No Brasil, os padrões de qualidade do ar foram estabelecidos pela Resolução do CONAMA n° 03/90, sendo classificados em padrões primários e secundários descritos conforme abaixo e detalhados na tabela 1:

“São padrões primários de qualidade do ar as concentrações de poluentes que, ultrapassadas, poderão afetar a saúde da população. Podem ser entendidos como níveis máximos toleráveis de concentração de poluentes atmosféricos, constituindo-se em metas de curto e médio prazo. São padrões secundários de qualidade do ar as concentrações de poluentes atmosféricos abaixo das quais se prevê o mínimo efeito adverso sobre o bem estar da população, assim como o mínimo dano à fauna e a flora, aos materiais e ao meio ambiente em geral. Podem ser entendidos como níveis desejados de concentração de poluentes, constituindo-se em meta de longo prazo.” (BRASIL, 2015).

Tabela 1. Padrões nacionais de qualidade do ar quanto ao material particulado

Poluente	Tempo de Amostragem	Padrão Primário ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Secundário ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Partículas totais em suspensão	24 horas MGA	240 80	150 60
Partículas inaláveis	24 horas MGA	150 50	150 50

Adaptada da Resolução Conama no 3, de 28/06/1990. MGA. Média Geométrica Anual

Dados atuais da Organização Mundial da Saúde (OMS) referentes a quase 1600 cidades, de 91 países, coletados de estações de monitoramento urbanos, residenciais, comerciais e em áreas mistas indicam que a média de exposição ao MP_{10} no mundo é de $71 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (variando de 26 a $208 \mu\text{g}/\text{m}^3$), sendo que a média nos países latino-americanos é de $51 \mu\text{g}/\text{m}^3$. No Brasil, a média de 56 estações, representando 40 cidades registrou uma média anual de MP_{10} de $41 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e de $\text{MP}_{2,5}$ de $22 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (OMS, 2014).

Nesse sentido, enfatiza-se a importância da realização de pesquisas que tenham como intuito elucidar os mecanismos pelos quais a exposição à poluição agrava a saúde, buscando alertar para a necessidade do desenvolvimento de políticas de saúde pública, em prol de padrões de qualidade do ar.

Efeitos da inalação de material particulado fino na saúde

Os efeitos da poluição atmosférica variam conforme o tempo de exposição aos agentes poluidores e a condição prévia de saúde, sendo único para cada indivíduo afetado (HU, 2012), seja em curto ou em longo prazo, a poluição do ar agride o organismo.

A penetração dos poluentes no organismo ocorre pela cavidade nasal ou oral, percorrendo todo o trato respiratório superior atingindo brônquios e bronquíolos, e alcançando os alvéolos. Dependendo do seu diâmetro, o MP pode se depositar nos alvéolos pulmonares e atingir a corrente sanguínea. A fisiopatologia dos danos decorrentes da inalação de MP envolve a diminuição da atividade mucociliar e dos macrófagos, produzindo irritação nas vias respiratórias e causando o estresse oxidativo, em consequência, a inflamação pulmonar e sistêmica. A exposição crônica produz remodelamento brônquico e doença pulmonar

obstrutiva crônica (DPOC), podendo ser cancerígeno. (Adaptado de KUNZLI, 2004 et al e HU, 2012).

Na exposição aguda ao MP, os efeitos normalmente geram um aumento da mortalidade por doenças respiratórias, maior frequência de infecções respiratórias, aumento do número de internações hospitalares por pneumonia e um aumento da prevalência de sintomas e sinais de irritação nos olhos, narinas e garganta. Na exposição crônica, os efeitos da poluição podem causar o aumento da incidência e prevalência de asma, acréscimo da incidência e mortalidade por câncer de pulmão, ampliação da incidência e de mortalidade por pneumonia e influenza, alterações crônicas na função pulmonar e menor desenvolvimento pulmonar em crianças e jovens (Adaptado de KUNZLI, et al., 2009 e ARBEX, 2004).

A exposição ao MP_{2,5} leva ao aumento principalmente na mortalidade e morbidade por doenças respiratórias e cardiovasculares, as quais estão epidemiologicamente associadas à inalação de partículas. O aumento da poluição do ar tem sido associado à redução da variabilidade da frequência cardíaca (indicador de risco para arritmia e morte súbita), à vasoconstrição e ao aumento da pressão arterial, todos, fatores de risco para doenças cardiovasculares (PETRY, 2011).

Em estudo duplo-cego, randomizado, realizado com 26 pacientes com insuficiência cardíaca e 15 voluntários de controle; os participantes foram expostos em 3 sessões separadas de ar limpo, exposição a escape dos motores diesel sem filtro ou ar filtrado. Foi avaliada a função endotelial por meio do índice de hiperemia reativa, rigidez arterial, marcadores biológicos de curta distância e a variabilidade da frequência cardíaca. Este estudo foi à primeira tentativa, até o momento, de mostrar que um filtro pode reduzir a disfunção endotelial aumentada em pacientes com insuficiência cardíaca durante a exposição. Assim, o uso generalizado de filtros em pacientes expostos à poluição do ar derivados do tráfego pode ter efeitos benéficos na saúde humana (VIEIRA, 2016).

Outro estudo prospectivo, abrangente e bem controlado, realizado por Pope (2004), encontrou risco aumentado de mortalidade relacionada à poluição do ar que variou de 8% a 18%, para diversos tipos de doenças cardíacas. E, estudo realizado em Dublin, Irlanda, por Clancy et al (2002), revelou que a redução dos níveis de poluentes do ar ocorrida naquela cidade implicou na diminuição da mortalidade por doenças cardiopulmonares, sugerindo a importância da adoção de medidas preventivas de âmbito coletivo.

Estresse oxidativo e material particulado fino

Nas células aeróbias, como as dos seres humanos, a maior parte do oxigênio (O_2) é reduzida a água (H_2O) nas mitocôndrias pelo processo de respiração celular. Cerca de 5% do O_2 é consumido em passos monoelétrônicos, ou seja, tem forte tendência a receber um elétron de cada vez, com formação de espécies intermediárias denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs).

Sendo assim, a produção de ERO é parte integrante do metabolismo humano, dispondo de um eficiente sistema antioxidante que servem como a enzima superóxido dismutase (SOD) e a enzima catalase (CAT). Estas são defesas antioxidantes enzimáticas que atuam com antioxidantes não enzimáticos, extraídos da dieta (vitamina A, C e E), doando elétrons para as EROs inibindo assim a sua ação lesiva no tecido cardíaco e pulmonar (SANTOS, 2014).

Além disso, as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) também são parte integrante do metabolismo humano e desempenha importante função biológica por meio de múltiplos processos enzimáticos, sobretudo no sistema imune e nas paredes vasculares. E para não existir esse de ERN_3 , o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que visa controlar e restabelecer o equilíbrio por meio de enzimas celulares antioxidantes como a glutathione peroxidase (GPx), SOD, CAT. Além disso, o organismo dispõe de defesas não enzimáticas como proteínas séricas (ceruloplasmina, transferrina), vitamina C, vitamina E, beta-caroteno, e glutathione reduzida (VASCONCELOS, 2007).

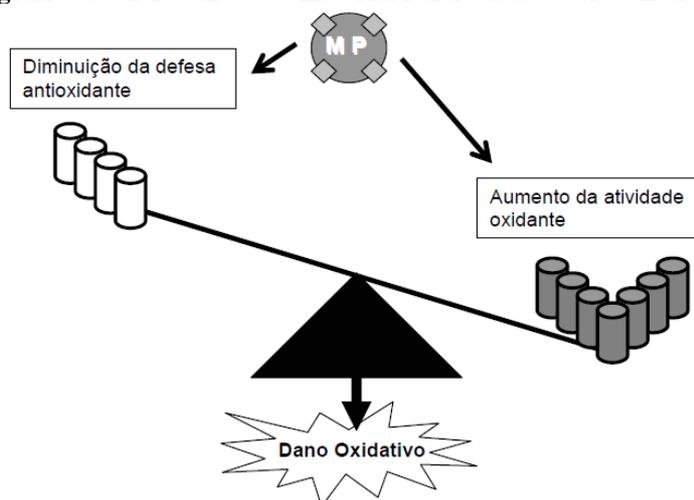
O estresse oxidativo (EO) é um resultado do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, tendo predomínio dos oxidantes, com danos consequentes. Quando a produção de EROs ou ERN_3 excede a capacidade natural de defesa do organismo, resulta em dano oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Este desequilíbrio pode acontecer após a exposição a agentes pró-oxidantes, como poluentes do ar (DELFINO et al., 2011) Portanto, a resposta antioxidante do organismo se constitui como importante mecanismo de defesa para auxiliar na manutenção do equilíbrio oxidativo diante da exposição ao MP (BROOK et al., 2010).

O desequilíbrio nos processos pró e antioxidantes pode desencadear alguns efeitos no organismo como o desenvolvimento de algumas doenças, entre elas, a aterosclerose, doença de Alzheimer, asma, artrite reumatóide, síndrome de insuficiência respiratória do adulto, esclerose múltipla e diabetes mellitus. Esse processo tem importância no envelhecimento e

nos mecanismos de morte celular, tendo por consequência a indução de câncer, assim como a arterosclerose, hipertensão arterial sistêmica, hipertrofia miocárdica (VASCONCELOS, 2007).

O aumento da produção de EROs, aliado à supressão das enzimas antioxidantes, é responsável pelo processo central de EO no pulmão em animais expostos ao MP (LI, XIA et al., 2016) (Figura 2). A citotoxicidade destas ERO como o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH), oxigênio singlet (O_2), óxido nítrico (ON), peróxido nítrico (ONOO-), ácido hipoclorídico (HOCL-), e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) se deve principalmente a redução de estruturas lipídicas, proteicas ou de bases nitrogenadas do DNA (RABÊLO et al;2010).

Figura 2. Representação gráfica do efeito direto do material Particulado sobre o Estresse Oxidativo



Fonte: Petry, 2011.

Em nosso grupo de pesquisa, recentemente, foram investigados os efeitos da inalação de $MP_{2.5}$ sobre parâmetros de EO. Um estudo com ratos exercitados expostos ao $MP_{2.5}$ demonstrou um aumento do EO cardiopulmonar (aumento na lipoperoxidação lipídica) sem causar alterações dos parâmetros hemodinâmicos (HECK, 2014 e HECK et al, 2014b). Outro trabalho, sobre a exposição aguda ao MP, porém sem exercício também resultou em EO plasmático, demonstrado pelo aumento de dano oxidativo proteico e ação ineficaz de defesas antioxidantes (BALDISSERA, 2014).

A exposição à poluição atmosférica por MP leva ao EO em diferentes órgãos, sendo, portanto, um potencializador para o surgimento de inúmeras doenças. As particularidades de cada indivíduo influenciam quão severos serão os efeitos da inalação de MP.

Nesse sentido, enfatiza-se a importância da realização de pesquisas que visem ilustrar os riscos da inalação de MP à saúde, como também a identificação de biomarcadores dos efeitos adversos dos poluentes do ar, cuja finalidade sirva para recomendar cuidados e a prevenção dos danos à saúde causados por poluentes atmosféricos em indivíduos susceptíveis.

Treinamento físico

É amplamente conhecida a necessidade das pessoas adotarem um estilo de vida saudável. Entre outros fatores, uma organização no estilo de vida saudável e regrado está relacionado com a inclusão ou escolha pela prática regular de atividades físicas e/ou de exercícios físicos. Atividade física é caracterizada como qualquer forma de atividade muscular e resulta no gasto energético proporcional ao trabalho muscular realizado. O exercício físico é planejado com o objetivo de melhorar ou manter o condicionamento físico representando um subgrupo da atividade física (POWERS e HOWLEY, 2000).

O exercício físico agudo, em decorrência do maior consumo de oxigênio em relação ao estado de repouso, promove o aumento da formação de EROs. No entanto, o treinamento físico regular é capaz de gerar adaptações eficazes e amenizar os efeitos danosos provocados pelos radicais livres. Estas adaptações estão relacionadas a uma série de sistemas, dos quais os mais importantes são os sistemas enzimáticos, compostos pela SOD, CAT e GPx. Tais adaptações, apesar das controvérsias sobre os mecanismos envolvidos, promovem maior resistência tecidual a desafios oxidativos, como, por exemplo, novas sessões de exercício físico (SCHNEIDER, 2004).

Uma carga isolada de trabalho exaustivo na musculatura esquelética leva ao aumento de lipoperoxidação, mas também gera aumentos na atividade de enzimas antioxidantes como glutathione redutase (GR), GPx, SOD e CAT. Na década de 90, descobriu-se em triatletas uma elevação na atividade da enzima antioxidante GPx nos eritrócitos, protegendo o organismo do dano à membrana celular. Além disso, estudos indicam que o próprio EO induzido pelo exercício pode disparar adaptações em resposta ao treinamento e que tais adaptações são tecido-específicas, sugerindo um mecanismo regulatório complexo. O treinamento pode

aumentar tanto a capacidade de resistência aeróbia quanto as defesas antioxidantes, limitando assim o dano tecidual causado por EROs (SCHNEIDER, 2004).

Tendo em vista que o exercício físico potencializa a formação de radicais livres, um cuidado quanto à intensidade de esforço passa a ter relação com o EO. Este pode ser responsável por aumentar a incidência de diversas lesões, alterar o sistema imunológico e reduzir o desempenho, ocasionando diversas doenças, incluindo cardiovasculares (FANHAN e FERREIRA, 2006). No entanto, esse estresse oxidativo agudo de cada sessão de exercício é gradativamente melhor tolerado pelo organismo treinado, o que sugere uma adaptação dos sistemas antioxidantes, e que quanto maior a carga de treinamento, maior magnitude da melhora do sistema antioxidante (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004). Portanto, a intensidade do esforço realizado passa a ser um tema importante quando se trata de adaptações antioxidantes.

Uma única sessão de exercício resulta em adaptações metabólicas tanto durante quanto após o esforço físico. Durante a atividade muscular a demanda energética pode superar a de repouso em até 35 vezes enquanto o consumo de oxigênio pode aumentar de 10 a 15 vezes. Desta forma, é possível relacionar o EO com a intensidade do exercício, uma vez que intensidades moderadas não parecem induzir danos oxidativos ao organismo, diferente do que ocorre com exercício de alta intensidade (ALESSIO, 1993). Semelhante correlação existe entre a concentração de lactato [LA], um marcador de intensidade, diminuída em exercício de baixa intensidade, sugerindo uma pequena LPO em exercícios submáximos. O dano oxidativo pode depender ainda do grau de exaustão e não diretamente da intensidade do exercício (VIÑA et al., 2000; HECK, 2007).

Durante o exercício agudo, mesmo que de intensidade moderada, a inalação de MP_{2.5} pode levar a estresse oxidativo cardiopulmonar (HECK et al; 2014a e HECK et al; 2014b). No entanto, no estudo de Petry et al.(2011), realizado com MP_{2.5} e treinamento físico, os resultados indicaram que a inalação aguda de partículas diminuiu a atividade da CAT no tecido cardíaco, enquanto que o treinamento aumentou a atividade da CAT no coração. No mesmo estudo, o exercício também preveniu o aumento da coagulabilidade do sangue induzido pela inalação aguda de ROFA.

Em suma, vários estudos relacionados à epidemiologia têm demonstrado forte relação da poluição atmosférica no desenvolvimento de doenças crônicas (SUN et al., 2009; PEARSON et al., 2010). A exposição crônica à poluição atmosférica, principalmente por

MP_{2,5} também promove aumento do EO, provocando prejuízos à saúde, principalmente em condições de disposições pré-existentes.

Proteínas de choque térmico

As proteínas de choque térmico (HSPs) são da família das chaperonas moleculares, são proteínas expressas praticamente em todos os organismos vivos e estão relacionadas com estratégias de sobrevivência do organismo e de longevidade frente a condições de estresse, aumentando assim as defesas celulares e facilitando a reparação de danos a proteínas. No ambiente extracelular, estas proteínas apresentam funções imunomoduladoras, facilitando a apresentação de peptídeos imunogênicos e atuando como estimuladores da resposta imune (HECK, 2011)

As HSPs são classificadas de acordo com suas massas moleculares em famílias (HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e HSP30). Dentre estas, as pertencentes à família de HSPs de 70 kDa (HSP70) são proteínas muito conservadas (SMOCK et al., 2011). As HSP70 são responsáveis por múltiplas funções citoprotetoras no ambiente intracelular e exercem forte papel imunomodulador quando extracelularmente localizadas (RADONS, 2016).

A primeira demonstração de expressão de HSP em resposta celular ao estresse foi relatada no ano de 1962 por Ferruccio Ritossa, que observou padrões de espessamento cromossomal em células de glândulas salivares de *Drosophila buskii*, situação que mostrava a síntese de HSPs após a exposição celular a temperaturas altas (DE MAIO, 2011).

Células, quando são expostas a injúria celular, adaptam o seu metabolismo para uma nova condição. A principal função é oferecer proteção futura para a manutenção do funcionamento celular normal. As HSPs desempenham papéis fundamentais em diferentes situações de estresse oxidativo, compreendendo múltiplos caminhos, como os processos celulares básicos de capacidade pró-oxidante/antioxidante, para a manutenção da homeostase. Portanto, durante uma situação de estresse, as ações das HSPs vão além de função de chaperona intracelular e prevenindo futuros danos celulares ativando vias de sinalização celular (DE MAIO, 2011).

Nos últimos anos, mostrou-se evidente que em condições de estresse (ex. exposição a níveis elevados de poluição) as células respondem expressando HSPs, situação designada de resposta celular ao estresse (MUKHOPADHYAY et al., 2003; KIDO et al., 2011).

A indução de HSPs, especialmente, a HSP70, com o aumento expressivo do conteúdo intracelular desta proteína, representa um fator potencial citoprotetor e antiinflamatório em inúmeras condições de estresse (HECK et al., 2011). Por outro lado, desafios extremos levam a aumento da exportação de HSP70 para o ambiente extracelular (eHSP72), nos quais exercem efeitos pró-inflamatórios. Assim, o equilíbrio entre o conteúdo extra/intracelular de HSP70 parece ser um importante indicador da condição de estresse celular do organismo (HECK, 2011, KRAUSE et al., 2015). Este estudo investiga a razão extra de HSP70 como biomarcador de estresse do organismo diante dos efeitos do treinamento físico combinado como inalação de material particulado.

Nessa direção, justifica-se o desenvolvimento deste trabalho, na busca de promover novos conhecimentos relacionados aos agravos da exposição à poluição atmosférica, bem como o potencial do treinamento físico como estratégia de promoção da saúde. Como instrumento de análise e considerando que a inalação de MP_{2.5} causa EO, e que, o treinamento físico, dependendo da intensidade de esforço, tem efeito benéfico sobre o mesmo, neste estudo experimental esperava-se que o treinamento físico em intensidade moderada pudesse evitar o EO decorrente da exposição ao MP_{2.5}. Já com o treinamento intenso, esperava-se o aumento do EO e dos níveis plasmáticos de eHSP72.

OBJETIVO GERAL

Avaliar se o treinamento físico de diferentes intensidades protege camundongos expostos cronicamente ao material particulado contra estresse oxidativo cardiopulmonar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do treinamento físico de diferentes intensidades em camundongos expostos cronicamente ao material particulado quanto a (ao):

- Níveis de Lipoperoxidação no coração e no pulmão

- Atividade das enzimas Catalase (CAT) e Superóxido dismutase (SOD) no coração e no pulmão

- Concentração de eHSP72 no Plasma.
- Concentração de lactato sanguíneo.
- Glicemia.
- Peso.
- Resposta ao GTT.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local de realização

Laboratório de Ensaio Biológicos (LEBio), Departamento de Ciência da Vida, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ (Rua do Comércio, nº 3000, Bairro Universitário, Ijuí, RS).

Animais

Foram utilizados 32 camundongos machos da linhagem B6129SF2/J, com 30 dias de idade, provenientes do biotério da UNIJUÍ. Os animais foram mantidos sob condições ideais de acondicionamento em biotério, em gaiolas semi metabólicas, sob ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, com controle da temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), recebendo água potável e ração ad libitum.

Foi respeitado os princípios éticos estabelecidos pelas “Normas Internacionais de Proteção aos Animais” (HOFF, 1980), “Código Brasileiro de Experimentação Animal” (1988), bem como pelo “Guia de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório” do National Institutes of Health. O trabalho foi aprovado no CEUA/UNIJUÍ (protocolo nº 011/2013). Este projeto teve financiamento via Edital Fapergs 001/2013 Programa Pesquisador Gaúcho – PqG, nº 002106-2551/13-5, projeto “HSP70 COMO BIOMARCADOR DO “PONTO CRÍTICO” DA REALIZAÇÃO DE EXERCÍCIO FÍSICO EXPOSTO À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA NO DIABETES”, coordenado por Thiago Gomes Heck

Delineamento experimental

Antes de qualquer intervenção, os 32 camundongos machos com 30 dias de idade foram avaliados biometricamente (pesados e medido o comprimento) e também realizado o Teste de Tolerância à Glicose (GTT). Os animais foram divididos nos grupos experimentais pareados pela resposta ao GTT. Foram realizadas duas intervenções durante 12 semanas: Treinamento físico e exposição ao MP_{2.5}. O exercício (subdividido em treinamento físico de

natação de intensidade moderada e intensa). A exposição ao MP_{2.5} foi realizada por administração intranasal de uma suspensão de MP_{2.5} mimetizando a exposição à poluição atmosférica. Cada intervenção foi acompanhada experimentalmente pelo respectivo grupo controle conforme descrito a seguir.

Os animais foram divididos em grupos de acordo com a administração intranasal (diariamente por 12 semanas) de solução fisiológica ou inalação de MP_{2.5} (grupos com a sigla MP_{2.5}). Estes grupos foram subdivididos ainda de acordo com a condição de exercício, sendo mantidos sedentários ou sendo treinados (5x/semana) em intensidade moderada (grupos com a sigla MOD) ou treinados em alta intensidade de esforço (grupos com a sigla INT) (tabela 2).

Foi verificada a concentração de lactato sanguíneo dos animais na 5^o semana (quando os grupos MOD estavam em treinamento de intensidade moderada) e na 9^o semana (quando os grupos INT já estavam em treinamento de alta intensidade) (figura 3). O GTT foi realizado na 4^o, 8^o e 12^o semana (figura 4). Após a 12^o semana os animais ficaram 48 horas sem manipulação ou intervenção e foram sacrificados com uso de guilhotina para roedores.

Tabela 2. Caracterização do protocolo experimental de treinamento de natação e exposição ao Material Particulado fino (MP_{2.5})

Identificação dos grupos	Protocolo de treinamento físico de natação periodizado para camundongos	Protocolo de exposição ao Material Particulado fino (MP_{2.5})
COM	Animais mantidos por 20 min, 5x/sem por 12 semanas, em água rasa (2cm) a 30°C, sem esforço físico.	Administração diária (7x/sem), por 12 semanas, de 10µL de NaCl 0,9% via instilação intranasal.
MOD	Natação (água 30°C, 20 cm de profundidade), 5x/sem, por 12 sem, iniciando por sessões de 20 min com 0% carga adicionada a cauda. Na 2º semana realizaram o treinamento com carga de 1%, na 3º semana com 2% e na 4º semana com 3% e na 5º semana com 4%. Em cada semana seguinte, a duração de cada sessão aumentou em 10 min, até atingir 60 min com 4% de carga na 9º semana, permanecendo com essa duração e intensidade de esforço até a 12º semana.	Administração diária (7x/sem), por 12 semanas, de 10µL NaCl 0,9% via instilação intranasal.
INT	Natação (água 30°C, 20 cm de profundidade), 5x/sem, por 12 sem, iniciando por sessões de 20 min com 0% carga adicionada a cauda. Em cada semana seguinte, a carga foi aumentada em 1% até atingir 20 min com 8% de carga na 9º semana, permanecendo com essa duração e intensidade de esforço até a 12º semana.	Administração diária (7x/sem), por 12 semanas, de 10µL de NaCl 0,9% via instilação intranasal.
MP_{2.5}	Animais mantidos por 20 min, 5x/sem por 12 semanas, em água rasa (2 cm) a 30°C, sem esforço físico.	Administração diária (7x/sem), por 12 semanas, de 5µg de MP _{2.5} via instilação intranasal (MP _{2.5} suspenso em 10µL de NaCl 0,9%).
MOD+ MP_{2.5}	Natação (água 30°C, 20 cm de profundidade), 5x/sem, por 12 sem, iniciando por sessões de 20 min com 0% carga adicionada a cauda. Na 2º semana realizaram o treinamento com carga de 1%, na 3º semana com 2% e na 4º semana com 3% e na 5º com 4% . Em cada semana seguinte, a duração de cada sessão aumentou em 10 min, até atingir 60 min com 4% de carga na 9º semana, permanecendo com essa duração e intensidade de esforço até a 12º semana.	Administração diária (7x/sem), por 12 semanas, de 5µg de MP _{2.5} via instilação intranasal (MP _{2.5} suspenso em 10µL de NaCl 0,9%).
INT+ MP_{2.5}	Natação (água 30°C, 20 cm de profundidade), 5x/sem, por 12 sem, iniciando por sessões de 20 min com 0% carga adicionada a cauda. Em cada semana seguinte, a carga foi aumentada em 1% até atingir 20 min com 8% de carga na 9º semana, permanecendo com essa duração e intensidade de esforço até a 12º semana.	Administração diária (7x/sem), por 12 semanas, de 5µg de MP _{2.5} via instilação intranasal (MP _{2.5} suspenso em 10µL de de NaCl 0,9%).

Fonte: Dados desta dissertação

Figura 3. Imagem ilustrativa da coleta de sangue para mensuração da concentração sanguínea de lactato



Fonte: Foto obtida durante os experimentos desta dissertação

Figura 4. Imagem ilustrativa do Teste de Tolerância à Glicose



Fonte: Foto obtida durante os experimentos desta dissertação

Tamanho Amostral

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado para utilização do menor número possível de animais em cada experimento. Considerando que o exercício moderado deve prevenir as alterações em parâmetros de estresse oxidativo gerados pelo MP_{2.5}, o tamanho da amostra foi calculado para detectar a menor diferença esperada entre os grupos Controle e MP_{2.5}. (De acordo com a GOETTEMS-FIORIN et al.,2014) a diferença esperada é de 0,08±0,07 nmol MDA/mg/proteína). Foi utilizado para o cálculo um poder estatístico de 80% para um nível de significância de 0,05%. Assim, foram necessários 5 a 6 animais por grupo, totalizando 32 camundongos.

Material particulado fino

O poluente utilizado foi contido em filtro de policarbonato, por meio de um coletador gravimétrico instalado no terraço da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na cidade de São Paulo, Brasil. Após a exposição à poluição (24 horas), o filtro foi retirado e a coleta das partículas aderidas no mesmo foram obtidas por meio do processo de sonicação em banho de ultrassom, realizado em 7 sessões de 50 minutos/cada, em meio aquoso. As partículas foram ressuspensas, na concentração de $5\mu\text{g}/10\mu\text{L}$, em solução fisiológica.

O processo de instilação intranasal foi realizado diariamente por 12 semanas, com auxílio de micropipeta automática. O animal foi contido pelo manipulador, sendo suspenso pela região cervical, sustentado com a mão sobre o dorso e os dedos retendo os membros anteriores e a cauda. O manipulador realizou a administração via intranasal (i.n.) da suspensão de Material Particulado Fino ($\text{MP}_{2,5}$) no roedor desprezando $10\mu\text{L}$ da suspensão na narina do animal, promovendo reflexo de apneia seguida de inspiração profunda, a qual impulsionou o líquido para os pulmões (GOETTEMS-FIORIN, 2014). Os grupos não expostos receberam, diariamente, $10\mu\text{L}$ de solução fisiológica (Figura 5).

Figura 5 . Imagem Ilustrativa da instilação intranasal de $\text{MP}_{2,5}$



Fonte: Foto obtida durante os experimentos desta dissertação

Protocolo de Treinamento físico moderado e intenso

O treinamento físico realizado pelos camundongos foi de natação. Antes do treinamento, os animais foram adaptados ao meio líquido (temperatura da água = $30^{\circ}\text{C}+1^{\circ}\text{C}$), durante dois dias por 10 minutos.

Treinamento físico moderado (grupos identificados com a sigla MOD): Na 1^o semana de treinamento físico, os animais nadaram 5 dias por 20 minutos. Na 2^o semana nadaram com carga equivalente a 1% do peso corporal adicionada à cauda por 20min. Na 3^o semana com 2% por 20min, na 4^o semana com 3% por 20min, e na 5^o semana com 4% por 20min. Nas

semanas seguintes a carga de 4% foi mantida e foi acrescido o tempo em 10 minutos a cada semana, atingindo 60 minutos de natação com carga de 4% na 9ª semana de treinamento. Os animais seguiram o treinamento com 4% por 60min até a 12ª semana.

Treinamento físico intenso (grupos identificados com a sigla INT): Na 1ª semana de treinamento físico, os animais nadaram 5 dias por 20 minutos. Na 2ª semana nadaram com carga equivalente a 1% do peso corporal adicionada à cauda por 20min. Na 3ª semana com 2% por 20min, na 4ª semana com 3% por 20min, e na 5ª semana com 4% por 20min. Nas semanas seguintes a duração de 20min foi mantida e a carga foi acrescida em 1% a cada semana, atingindo 20 minutos de natação com carga de 8% na 9ª semana de treinamento. Os animais seguiram o treinamento com 8% por 20min até a 12ª semana (Figura 6).

Figura 6. Imagem ilustrativa do protocolo de repouso e treinamento físico de natação



Fonte: Foto obtida durante os experimentos desta dissertação

Perfil glicêmico

A concentração de glicose sanguínea foi verificada antes de qualquer intervenção, na 4ª, 8ª e 12ª semana de treinamento, com Glicosímetro Optium Xceed da Abbott, em punção venosa na parte distal da cauda dos animais.

Teste de tolerância à glicose (GTT)

Antes de qualquer intervenção, na 4ª, 8ª e 12ª semana de experimento, os animais foram submetidos ao Teste de Tolerância à Glicose (GTT). Após jejum de 12 horas, foi verificada a glicemia no tempo zero (tzero). Posteriormente, foi administrada solução de glicose via intraperitoneal (i.p.), na dose de 1g/Kg e realizado o monitoramento da glicemia

nos tempos 30 e 120 minutos. A resposta glicêmica durante o GTT foi avaliada pelo cálculo da área sob a curva (ASC) e área incremental sob a curva (AISC) de glicose pelo método do trapézio (MATTHEWS et al., 1990).

Peso corporal

O peso corporal dos animais foi avaliado semanalmente a partir do início do protocolo experimental até o último dia de experimento. Após a eutanásia dos animais, o coração, o pulmão e o plasma foram imediatamente coletados e congelados para posterior análise.

Lactato sanguíneo

A determinação do lactato foi realizada por meio de uma única punção na parte distal da cauda do animal, no final da sessão de natação. Desta punção, foram coletados 25 µL de sangue para análise em lactímetro (Accutrend® Plus, Roche), sendo o resultado expresso em mMol/L de sangue.

Preparação dos tecidos

Ao término dos experimentos com os animais, os mesmos foram mortos por decapitação. O sangue do tronco dos animais foi coletado com EDTA e centrifugado a 3000 rpm por 5 min e o plasma foi aliquoteado. Foram retirados o coração, pulmão e o plasma. Os órgãos foram homogeneizados em 9 volumes de 120mM KCl, 30 mM de Tampão kpi (pH7,2) com PMSF, para análises enzimáticas (SOD e CAT) e de TBARS (NEVES, 1997).

Determinação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT

A atividade da Superóxido Dismutase (SOD) foi avaliada pelo método Marklund e Marklund (1974), a 420 nm. A reação consiste na inibição da auto-oxidação do pirogalol pela atividade da enzima SOD. A atividade da Catalase (CAT) foi determinada por meio da decomposição do peróxido de hidrogênio a 25°C, em 240nm de absorbância (AEBI, 1984). Os resultados foram expressos respectivamente em U SOD /mg proteína e U CAT/mg proteína.

Dosagem de proteínas e lipoperoxidação

A concentração de proteína e determinação da lipoperoxidação nos homogeneizados, foram determinados pelos métodos espectrofotométricos a 595 e a 535nm, respectivamente, utilizando curva padrão de albumina (BRADFORD, 1976) e curva padrão de MDA (BUEGE e AUST, 1978). O nível de lipoperoxidação avaliado pelo teste de substâncias reativas ao ácido tio-barbitúrico (TBARS) foi expressa em MMOL de malonaldeído (MDA) por mg de proteína.

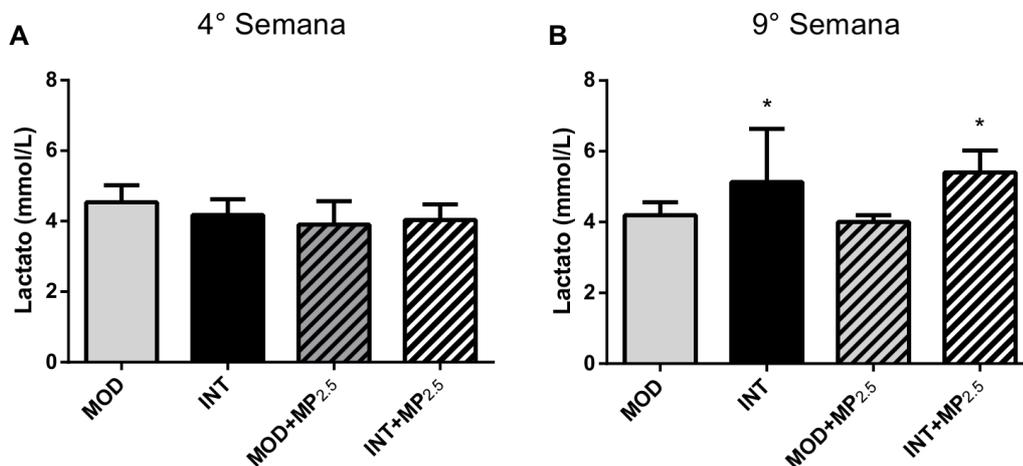
Análise estatística.

Os dados foram apresentados como média \pm desvio da média e analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey ($P < 0.05$), em Graphpad prism 6.0.

RESULTADOS

Os animais foram submetidos ao treinamento físico periodizado, sendo verificado o nível de lactato sanguíneo na 5^o semana, quando os animais atingiram 4% de carga acoplada à cauda. Nesta sessão de treinamento físico os animais atingiram ao final da sessão uma concentração sanguínea de lactato próximo a 4 mmol/L em todos os grupos treinados, sem influência da exposição ao MP_{2,5} (Figura 7A). A partir desta semana, os grupos MOD e MOD+MP_{2,5} mantiveram a carga de treinamento de 4% enquanto que os animais dos grupos INT e INT+MP_{2,5} aumentaram a intensidade progressivamente (1% por semana) até atingir 8% de carga na 9^o semana. Na avaliação da concentração de lactato realizada na 9^o semana de treinamento, os grupos MOD e MOD+MP_{2,5} ainda apresentaram concentrações de lactato sanguíneo próximas a 4 mmol/L, independentemente de serem expostos ao MP_{2,5}. Já os animais dos grupos submetidos ao treinamento intenso (INT e INT+MP_{2,5}) alcançaram valores maiores do que os grupos MOD e MOD+MP_{2,5} (Figura 7B). As concentrações de lactato sanguíneo refletem a realização de treinamento em intensidades diferentes de exercício sem influência da exposição ao MP_{2,5}.

Figura 7. Concentração de lactato sanguíneo em camundongos expostos ao material particulado fino após uma sessão de treinamento de natação periodizado



Valores de lactato sanguíneo (mmol/L, media \pm dp) na 5ª semana de treinamento (A) e na 9ª Semana de treinamento (B). Na 5ª semana todos os animais nadaram 20 minutos com 4% de carga acoplada a cauda. Na 9ª os animais MOD e MOD+PM_{2.5} nadaram 60 minutos com 4% de carga acoplada a cauda e os animais dos grupos INT e INT+PM_{2.5} nadaram 20 minutos com 8% de carga (n = 5 a 6 animais p/grupo).. *vs MOD e MOD+PM_{2.5} (P = 0,039). Anova de 1 via seguido pelo teste post hoc de Tukey. Fonte: Dados desta dissertação

Os animais foram avaliados quanto ao peso corporal, a glicemia de jejum e a resposta ao GTT antes de qualquer intervenção, na 4^o, 8^o e 12^o semana de experimento. Não houve modificações no peso (Tabela 3), na glicemia de jejum (Tabela 4) ou na resposta ao GTT (Figura 8) em decorrência do treinamento, da exposição ao MP_{2,5}, ou da combinação destes fatores.

Tabela 3. Peso corporal de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas

	CON	MOD	INT	MP _{2,5}	MOD +MP _{2,5}	INT +MP _{2,5}	ANOVA
Inicial	19,0 ± 3,0	18,0 ± 1,8	19,0 ± 1,7	18,5 ± 3,1	17,6 ± 2,3	19,5 ± 2,2	0,825
4^o Semana	24,6 ± 2,2	23,5 ± 2,7	24,9 ± 0,5	24,9 ± 2,1	23,1 ± 2,3	22,2 ± 4,0	0,410
8^o Semana	27,3 ± 1,8	24,7 ± 2,5	25,3 ± 0,9	28,1 ± 2,7	27,1 ± 3,0	25,2 ± 3,9	0,874
12^o semana	28,0 ± 3,6	26,7 ± 2,2	26,7 ± 2,5	28,7 ± 2,8	27,9 ± 2,9	26,0 ± 3,3	0,772

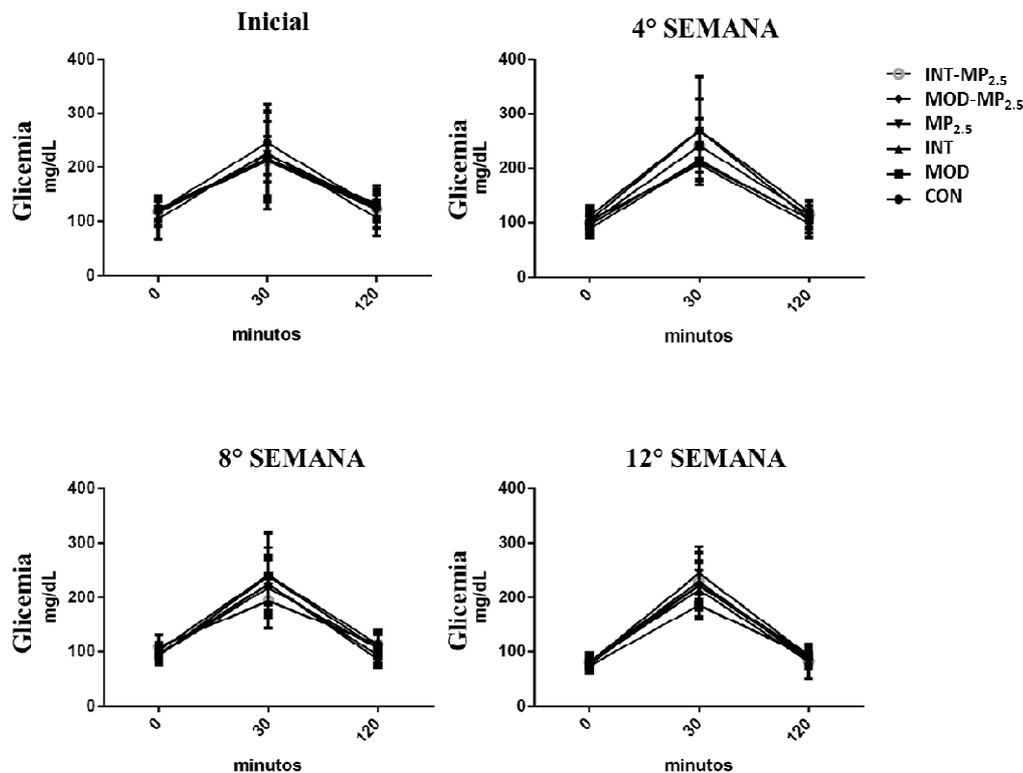
Dados (peso corporal em gramas, média ± desvio padrão) obtidos após 12 semanas de experimento em camundongos que: **CON** = Receberam diariamente 10µl de solução fisiológica intranasal. **MOD** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4%. **INT** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8%. **MP_{2,5}** = Receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl. **MOD+MP_{2,5}** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl. **INT+MP_{2,5}** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl (n = 5 a 6 animais p/grupo). Anova de 1 via. Fonte: Dados desta dissertação

Tabela 4. Glicemia de jejum de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas

	CON	MOD	INT	MP _{2,5}	MOD+MP _{2,5}	INT+MP _{2,5}	ANOVA
Inicial	120,3 ± 6,4	123,6 ± 23,0	127,2 ± 26,2	116,0 ± 22,4	104,8 ± 37,9	119,2 ± 27,4	0,845
4° Semana	112,5 ± 19,5	96,2 ± 23,9	85,6 ± 13,7	104,8 ± 23,0	104,0 ± 14,8	99,2 ± 16,6	0,330
8° Semana	102,5 ± 14,7	93,4 ± 14,7	96,0 ± 19,6	94,8 ± 15,2	96,2 ± 15,1	109,4 ± 22,0	0,652
12° semana	91,5 ± 21,3	74,0 ± 10,9	80,7 ± 17,0	80,1 ± 8,8	77,2 ± 15,6	81,6 ± 4,0	0,460

Dados (Glicemia em mg/dl, média ± desvio padrão) obtidos após 12 semanas de experimento em camundongos que: **CON** = Receberam diariamente 10µl de solução fisiológica intranasal. **MOD** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4%. **INT** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8%. **MP_{2,5}** = Receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl. **MOD+MP_{2,5}** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl. **INT+MP_{2,5}** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl (n = 5 a 6 animais p/grupo). Anova de 1 via. Fonte: Dados desta dissertação. Fonte: Dados desta dissertação

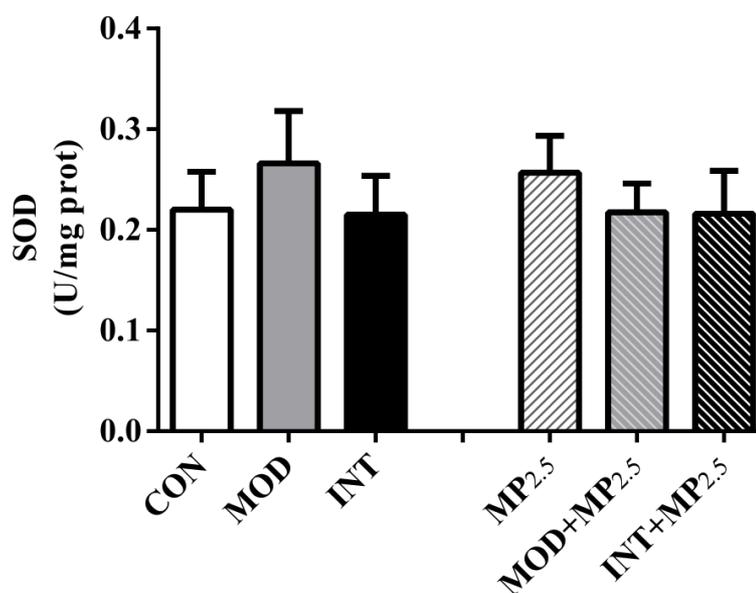
Figura 8. Resposta ao teste de tolerância a glicose de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas



Dados (Glicemia em mg/dl, média \pm desvio padrão) obtidos antes de qualquer intervenção, na 4° 8° e 12° semana de experimento em camundongos que: **CON** = Receberam diariamente 10 μ l de solução fisiológica intranasal. **MOD** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4%. **INT** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8%. **MP_{2.5}** = Receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5 μ g/10 μ l. **MOD+MP_{2.5}** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5 μ g/10 μ l. **INT+MP_{2.5}** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5 μ g/10 μ l (n = 5 a 6 animais p/grupo). (P > 0,05) Anova de 1 via. Fonte: Dados desta dissertação.

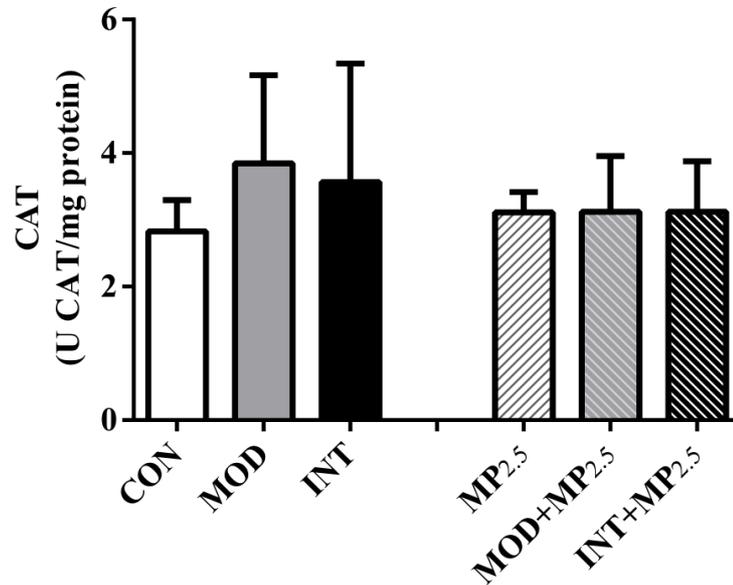
Neste estudo investigamos variáveis indicativas de EO, como a atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD além dos níveis de lipoperoxidação dos tecidos cardíaco e pulmonar, como forma de explicitar os efeitos do treinamento físico sobre estes parâmetros, na presença ou não de MP_{2.5}. Não foram observadas alterações na atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD (Figuras 9 e 10) no tecido cardíaco. Nos grupos que realizaram exercício e foram expostos ao MP_{2.5} (MOD+MP_{2.5} e INT+MP_{2.5}) foram observados níveis mais elevados de lipoperoxidação cardíaca quando comparado com os animais do grupo MP_{2.5} (Figura 11). Além disso, o grupo MOD+MP_{2.5} apresentou maiores níveis de lipoperoxidação no coração do que o grupo MOD (Figura 11).

Figura 9. Atividade da enzima antioxidante SOD no coração de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas



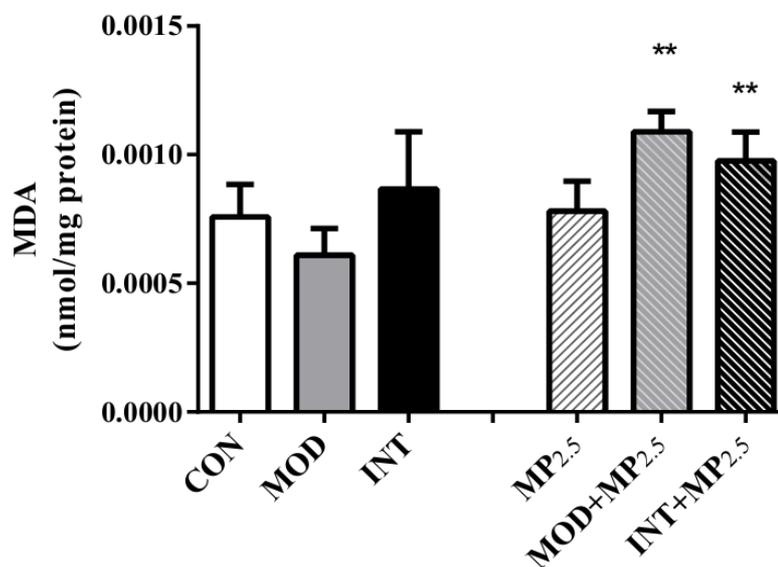
Dados obtidos após 12 semanas de experimento em camundongos que: **CON** = Receberam diariamente 10µl de solução fisiológica intranasal. **MOD** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4%. **INT** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8%. **MP_{2.5}** = Receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl. **MOD+MP_{2.5}** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl. **INT+MP_{2.5}** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl (n = 4 a 6 animais p/grupo). P = 0,183 Anova de 1 via. Fonte: Dados desta dissertação.

Figura 10. Atividade da enzima antioxidante CAT no coração de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas



Dados obtidos após 12 semanas de experimento em camundongos que: **CON** = Receberam diariamente 10 μ l de solução fisiológica intranasal. **MOD** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4%. **INT** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8%. **MP_{2.5}** = Receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5 μ g/10 μ l. **MOD+MP_{2.5}** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5 μ g/10 μ l. **INT+MP_{2.5}** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5 μ g/10 μ l (n = 5 a 6 animais p/grupo). P = 0,537. Anova de 1 via. Fonte: Dados desta dissertação.

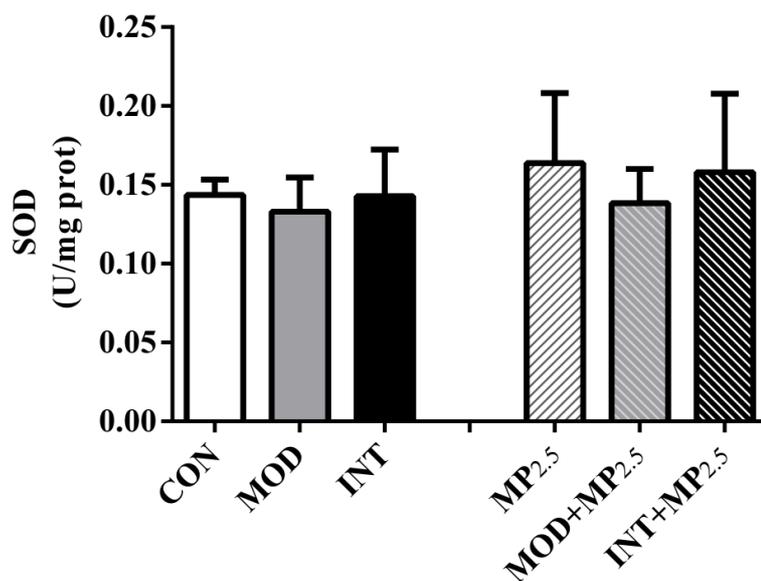
Figura 11. Lipoperoxidação no coração de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas



Dados obtidos após 12 semanas de experimento em camundongos que: **CON** = Receberam diariamente 10 μ l de solução fisiológica intranasal. **MOD** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4%. **INT** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8%. **MP_{2.5}** = Receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5 μ g/10 μ l. **MOD+MP_{2.5}** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5 μ g/10 μ l. **INT+MP_{2.5}** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5 μ g/10 μ l (n = 3 a 5 animais p/grupo). P = 0,001. ** vs CON, MOD e MP_{2.5}. Anova de 1 via. Fonte: Dados desta dissertação.

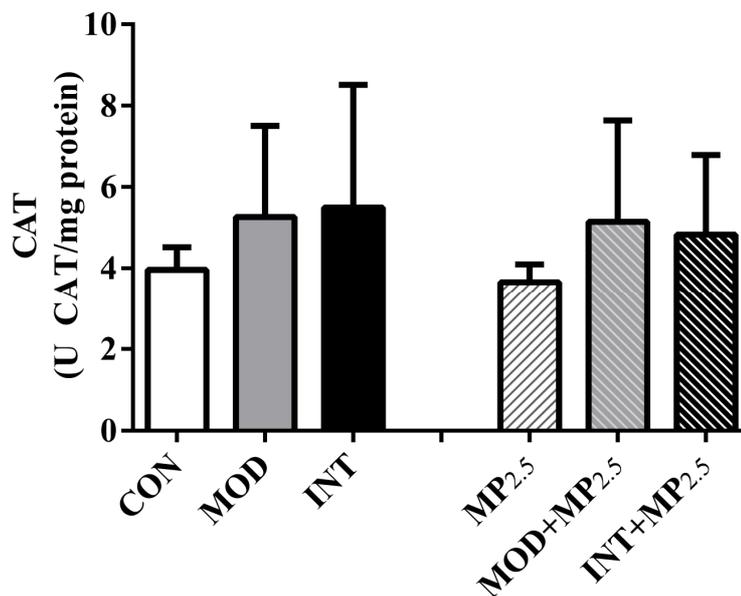
No tecido pulmonar também não foram observadas alterações na atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD (Figuras 12 e 13) em nenhum grupo. No entanto, o grupo INT+MP_{2.5} apresentou níveis de lipoperoxidação pulmonar maiores do que todos os demais grupos (Figura 14).

Figura 12. Atividade da enzima antioxidante SOD no pulmão de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas



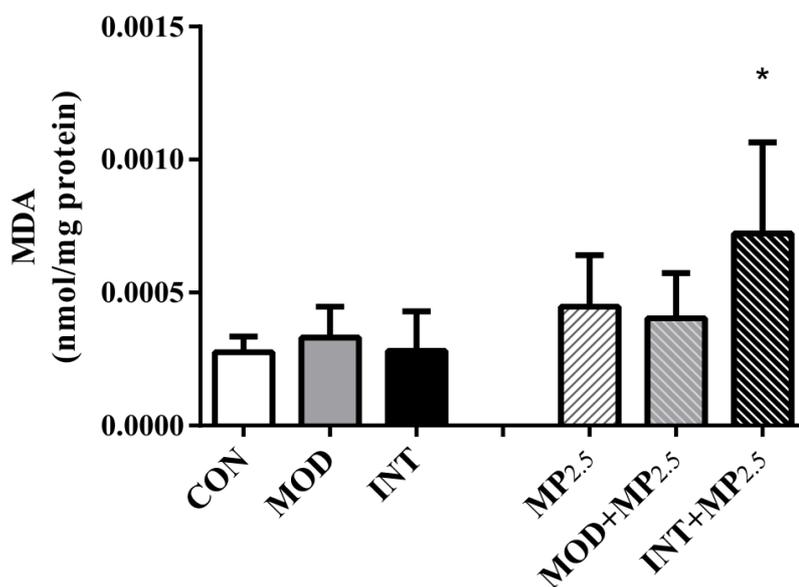
Dados obtidos após 12 semanas de experimento em camundongos que: **CON** = Receberam diariamente 10µl de solução fisiológica intranasal. **MOD** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4%. **INT** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8%. **MP_{2.5}** = Receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl. **MOD+MP_{2.5}** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl. **INT+MP_{2.5}** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl (n = 4 a 6 animais p/grupo). P = 0,664. Anova de 1 via. Fonte: Dados desta dissertação.

Figura 13. Atividade da enzima antioxidante CAT no pulmão de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas



Dados obtidos após 12 semanas de experimento em camundongos que: **CON** = Receberam diariamente 10µl de solução fisiológica intranasal. **MOD** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4%. **INT** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8%. **MP_{2.5}** = Receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl. **MOD+MP_{2.5}** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl. **INT+MP_{2.5}** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl (n = 5 a 6 animais p/grupo). P = 0,538. Anova de 1 via. Fonte: Dados desta dissertação.

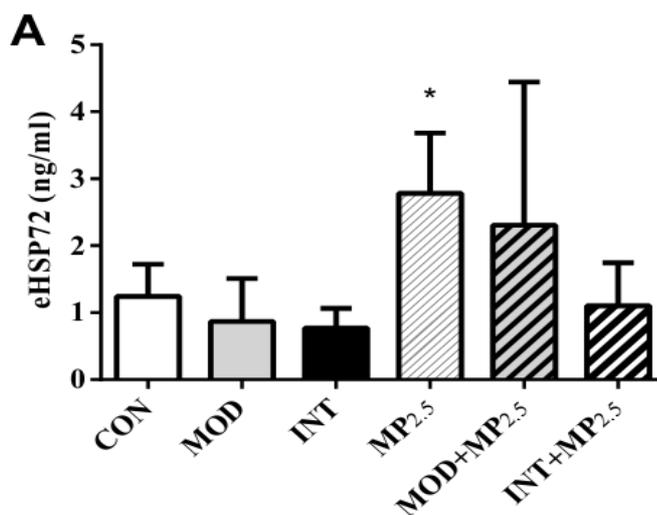
Figura 14. Lipoperoxidação no pulmão de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas



Dados obtidos após 12 semanas de experimento em camundongos que: **CON** = Receberam diariamente 10µl de solução fisiológica intranasal. **MOD** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4%. **INT** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8%. **MP_{2.5}** = Receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl. **MOD+MP_{2.5}** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl. **INT+MP_{2.5}** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl (n = 4 a 6 animais p/grupo). P = 0,014. * vs todos os grupos. Anova de 1 via. Fonte: Dados desta dissertação.

Os níveis plasmáticos de eHSP72 não foram alterados pelo treinamento MOD ou INT em relação ao grupo CON. A exposição crônica ao MP_{2.5} elevou de 1,24 ng/ml (CON) para 2,78ng/ml (MP_{2.5}) os níveis de eHSP72. Por outro lado, no grupo INT+MP_{2.5} a concentração plasmática de eHSP72 foi menor que o grupo MP_{2.5}. (Figura 15).

Figura 15. Concentração de eHSP72 no plasma de camundongos expostos ao material particulado fino e submetidos ao treinamento de intensidade moderada e intensa por 12 semanas



Dados obtidos após 12 semanas de experimento em camundongos que: **CON** = Receberam diariamente 10µl de solução fisiológica intranasal. **MOD** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4%. **INT** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8%. **MP_{2.5}** = Receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl. **MOD+MP_{2.5}** = Treinaram 5x/sem até 60 min por sessão com carga adicionada a cauda de 4% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl. **INT+MP_{2.5}** = Treinaram 5x/sem até 20 min por sessão com carga adicionada a cauda de 8% e receberam diariamente administração intranasal de material particulado fino 5µg/10µl (n = 4 a 6 animais p/grupo). P = 0,031 *vs CON, MOD, INT, INT+MP_{2.5}. Anova de 1 via. Fonte: Dados desta dissertação.

DISCUSSÃO

O exercício em ambiente com altos níveis de poluentes atmosféricos (CO, O₃, SO₂, NO₂, MP), pode levar a uma diminuição do consumo máximo de oxigênio e aumento concomitante dos níveis de lactato sanguíneo. Esse conjunto é responsável pela redução da capacidade de realização de exercício aeróbico decorrente da formação de carboxihemoglobina. A formação de carboxihemoglobina leva o organismo a entrar antecipadamente em predominância de rotas metabólicas anaeróbicas durante o esforço, resultando na diminuição do limiar anaeróbio e finalmente, na produção aumentada e acúmulo de lactato no musculo em atividade e no sangue, reduzindo a capacidade de realização de esforço (KARGARFARD et al., 2011). No entanto, em nosso estudo, com um único poluente, e sendo este o MP_{2.5}, este efeito (formação excessiva de carboxihemoglobina) pode não ocorrer, portanto não influenciando nos níveis de lactato sanguíneo.

Poderia ser esperado ainda, que a exposição ao MP_{2.5}, diariamente, interferisse no metabolismo dos animais, alterando o peso e/ou o metabolismo e/ou a homeostase glicêmica (GOETTEMS-FIORIN, 2014; GOETTEMS-FIORIN et al., 2016). Deste modo, um prejuízo no desempenho dos animais expostos ao MP_{2.5} durante o treinamento poderia ser demarcado pelo aumento da dificuldade de realização de exercício, o que por sua vez, poderia ser identificado por um aumento nos níveis sanguíneos de lactato (BARON, 2008). Mas a exposição ao MP_{2.5} também não interferiu na massa corporal, glicemia de jejum e na resposta aos GTTs ao longo das 12 semanas de experimento. A exposição ao MP_{2.5} tem sido associado aumento no risco de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2, tanto em estudos epidemiológicos como experimentais (GOETTEMS-FIORIN et al., 2016). Em dois estudos do nosso grupo com camundongos machos com 21 dias de idade (GOETTEMS, 2014; SALAMONI, 2015), com dieta hiperlipídica e exposição diária ao MP_{2.5}, foram observadas alterações indesejáveis na glicemia de jejum, no peso corporal, adiposidade e na resposta ao GTT.

Portanto, quando associado à uma condição de estresse metabólico, como o consumo de dieta hiperlipídica, a exposição ao MP_{2.5} agrava os efeitos metabólicos causados por esta dieta, prejudicando o quadro de intolerância a glicose e resistência a insulina, mas não ocorre em animais que consomem dieta padrão (GOETTEMS-FIORIN et al., 2016). Assim, nosso estudo, juntamente com os estudos anteriores, confirma que a exposição ao MP_{2.5} *per se*, nas

doses estudadas, não causa alterações metabólicas, não modificando os dados biométricos, glicêmicos ou a concentração de lactato após o esforço.

Em nosso estudo, até a 9^o semana de treinamento, após uma sessão de treinamento com 4% de carga (MOD e MOD+MP_{2.5}) os camundongos apresentaram valores de concentração de lactato sanguíneo próximas a 4,0 mmol/L, enquanto que na 9^o semana, após uma sessão de treinamento com 8% de carga (INT e INT+ MP_{2.5}), os camundongos atingiram valores médios próximos de 5,5 mmol/L.

A concentração sanguínea de lactato reflete qual a intensidade do esforço realizado em resposta a uma sessão de exercício físico (GOODWIN et al., 2007). Neste sentido, a utilização desta variável biológica (concentração de lactato sanguíneo) é constantemente adotada como marcador da intensidade de exercício físico também em pesquisa com modelos animais, inclusive em protocolo de exercício de natação (GOBATTO et al., 2001). Ainda, a utilização de natação como modelo de exercício físico apresenta vantagens sobre a corrida em esteira, uma vez que nadar é uma capacidade natural do animal, não necessitando, portanto, escolha de animais, o que geralmente é necessário em protocolos experimentais em esteira (KREGEL et al., 2006).

Conforme sugerido pelo estudo de Gobatto et al. (2001), as concentrações de lactato sanguíneo próximos a 5,5 mmol/l representam exercício de alta intensidade. Os valores de lactato sanguíneo com carga de 8% poderiam ser ainda maiores em animais sedentários (por exemplo, próximos a 10 mmol/l) (HECK, 2011). Assim, de acordo com Ferreira et al. (2007), nosso protocolo foi capaz de gerar uma adaptação metabólica prevista pelo treinamento físico regular, como a melhora na taxa de degradação de lactato, resultando em concentrações não tão elevada de lactato no sangue, mesmo com 8% de carga. Neste sentido, após um teste de esforço com 5% de carga por 15 minutos, camundongos com adaptações musculares apresentam concentrações de lactato próximas a 5,3 mmol/l enquanto sedentários apresentam 6,3 mmol/l (LIN, 2015). Comparativamente, este dado sugere uma adaptação física atingida nos grupos que treinaram com 8% de carga.

Cargas de 4% adicionadas à base da cauda de ratos, durante o nado, promovem um esforço físico entre 65 e 70% do consumo máximo de oxigênio, sugerindo assim, essa carga como a condição de exercício físico moderado (com concentração de lactato sanguínea próximas a 4 mmol/l (KREGEL et al., 2006) e as cargas acima desta, representam exercícios próximos ao consumo máximo de oxigênio, ou seja, acima do limiar anaeróbico, em humanos e em roedores.

Esses dados caracterizam o protocolo aqui proposto como um experimento que reflete adequadamente diferentes intensidades (moderada e intensa) de treinamento físico em camundongos. Estes dados indicam ainda uma adaptação metabólica ao treinamento regular periodizado, pois mesmo em 8% de carga, a concentração de lactato no sangue não foi tão elevada, diferentemente do observado em animais sedentários em outros estudos (GOBATO et al., 2001; FERREIRA et al., 2007). Em protocolos de treinamento semelhantes ao nosso, (ratos submetidos ao treinamento aeróbio de natação com de 5,0 % do seu peso corporal, 1h/dia, 5X/semana, por oito semanas) apresentam valores de lactato sanguíneo semelhantes após o exercício e geram adaptações antioxidantes (VIEIRA JÚNIOR, 2016). Em conjunto, as evidências indicam que os animais deste estudo tiveram condições de gerar adaptações ao treinamento físico regular, e assim, mostrando a eficácia do protocolo de treinamento físico periodizado de natação em camundongos proposto aqui, podendo assim ser investigado os efeitos da combinação com a inalação de MP_{2.5}.

Sabe-se que o exercício potencializa a formação de radicais livres, sendo que a intensidade de esforço tem relação com os níveis de biomarcadores de EO. No entanto, o estresse agudo de cada sessão de exercício é progressivamente melhor aceitável pelo organismo treinado, sugerindo adaptações dos sistemas antioxidantes. Há indicativos de que quanto maior a carga do exercício, maior é a melhora do sistema antioxidante (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). O aumento nos níveis de lipoperoxidação e da atividade das enzimas antioxidantes em tecidos pode ser gerado por uma sessão isolada de trabalho exaustivo, e neste sentido, o próprio EO induzido decorrente do exercício pode disparar adaptações em resposta ao treinamento que podem aumentar tanto a capacidade de resistência aeróbia quanto as defesas antioxidantes, limitando assim o dano tecidual causado pelas EROs (SCHNEIDER, 2004).

Em um estudo realizado com ratos, durante 16 semanas submetidos ao protocolo de exercício físico de natação, notou-se que os animais treinados, quando comparados aos sedentários, apresentaram aumento na atividade antioxidante levando à redução de agentes oxidantes e prevenção de EO tecidual no tecido cardíaco. (SANTOS et al., 2014). Estes dados são indicativos de que o exercício físico realizado adequadamente proporciona importantes adaptações metabólicas no organismo, contribuindo para a prevenção, redução de danos oxidativos causados por agentes externos. Porém, estas adaptações podem depender, ainda do grau de exaustão e não diretamente da intensidade do esforço físico realizado (VIÑA et al., 2000; HECK, 2007;).

Por outro lado, em animais expostos ao MP urbano de maneira aguda, já é possível observar os efeitos oxidativos da inalação de poluentes. Em um estudo com ratos, divididos em três experimentos (exposição de 6 horas, exposição de 20 horas, ambos de forma contínua e exposição por 5 dias intermitentes, 4h por dia, totalizando 20h) os animais que estiveram expostos durante 20h contínuas tiveram um aumento significativo de lipoperoxidação no tecido cardíaco e pulmonar (PEREIRA, 2007). O estresse oxidativo faz parte das consequências da ativação dos próprios mecanismos de defesa celular, porém, capazes de gerar efeitos agudos e/ou crônicos indesejáveis que podem representar prejuízos à saúde humana.

Muitos estudos têm sido realizados sobre as avaliações periódicas do nível de MP na atmosfera, os quais auxiliam na compreensão dos efeitos da poluição na saúde humana. Diferentes escalas de tempo de exposição à poluição e diferentes concentrações já demonstraram gerar respostas no organismo, como o desencadeamento de doenças cardiovasculares e pulmonares (POPE, 2013). A penetração dos poluentes acontece pela cavidade nasal e oral, percorrendo todo o trato respiratório superior atingindo brônquios e bronquíolos, alcançando os alvéolos. Dependendo do seu diâmetro, o MP pode se depositar nos alvéolos pulmonares e atingir a corrente sanguínea (KUNZLI et al., HU, 2012). Os efeitos oxidantes conhecidos pela inalação de MP_{2.5} (GONZALES-FLECHA, 2004), sem a compensação das defesas SOD e CAT, o EO gerado pode gerar uma predisposição ao surgimento de doenças cardiopulmonares (DELFINO et al., 2011).

Em nosso estudo, foi utilizado o MP_{2.5}, também utilizado em estudos anteriores (GONZÁLEZ FLECHA, 2004; XU et al., 2010). No estudo realizado pelo nosso grupo, com camundongos B6 com 21 dias de idade de (SALAMONI, 2015), no qual os animais receberam dieta hiperlipídica e foram expostos diariamente ao MP_{2.5} durante 12 semanas, foi possível observar aumento de dano oxidativo proteico e alterações das defesas antioxidantes enzimáticas do pulmão, observado pelo aumento da atividade da SOD. Em outro estudo do nosso grupo (GOTTEMS-FIORIN, 2014), a exposição de longo prazo de MP_{2.5} piorou a resposta glicêmica à sobrecarga de glicose em animais previamente tratados com dieta hiperlipídica, e promoveu alterações relevantes no perfil oxidativo e na expressão de HSP70 em tecidos relacionados ao metabolismo de nutrientes (fígado pâncreas, músculo gastrocnêmio e adipócitos). Em ambos os trabalhos citados acima, há indicativos de que cada tecido tem sua resposta característica diante do desafio imposto pela exposição ao MP_{2.5},

sendo que o coração pode ser um dos órgãos que apresenta grande suscetibilidade a alterações oxidantes (DAMIANI et al., 2012; SALAMONI, 2015; COSTA BEBER, 2015).

São poucos os estudos que investigam a combinação de exercício e exposição ao MP_{2.5}. Estudo realizado com ratos submetidos ao MP urbano durante o exercício agudo de natação de 20 ou 60 minutos indicou que os animais que estiveram expostos às partículas ambientais urbanas durante 60 minutos apresentaram maior lipoperoxidação no pulmão e menor atividade da CAT (HECK et al., 2014). Em outro estudo agudo, a inalação de ROFA previamente ao exercício, levou ao aumento nos níveis de lipoperoxidação cardiopulmonar, porém, sem resultar em alterações hemodinâmicas nos animais (HECK et al., 2014b). Estes dados indicam que a interação aguda entre MP e exercício pode representar um risco subclínico cardiopulmonar, levando ao questionamento sobre os efeitos a longo prazo.

No estudo de Petry et al., 2011, o treinamento físico de 10 semanas aumentou a atividade da enzima antioxidante CAT nos tecidos cardíaco e pulmonar de ratos. Esta adaptação foi capaz de evitar o aumento nos níveis de lipoperoxidação pulmonar e o efeito pró-coagulante causado pela exposição à partículas por 3 dias consecutivos. Contudo, a inalação do ROFA foi subaguda, administrada na última semana de treinamento físico por três dias consecutivos. Em nosso estudo os animais foram expostos ao MP_{2.5} e submetidos ao treinamento físico em intensidade moderada e intensa cronicamente durante 12 semanas, e não apresentaram alterações na atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD no tecido cardíaco e pulmonar. Porém, foram mensurados maiores níveis de lipoperoxidação no coração nos grupos que se exercitaram e inalaram MP (MOD-MP_{2.5} e INT-MP_{2.5}) quando comparado com o grupo sedentário que inalou MP_{2.5}. No pulmão a lipoperoxidação foi maior no grupo INT-MP_{2.5} do que os demais grupos.

O tecido cardíaco parece ser mais suscetível a efeitos oxidativos quando comparado com o tecido pulmonar, em experimentos crônicos com MP_{2.5} (DAMIANI et al., 2012). Em nosso trabalho o tecido cardíaco foi afetado pela inalação de MP em ambas as intensidades de exercício, enquanto que o pulmão só foi afetado pela alta intensidade de treinamento concomitante a inalação de MP, corroborando com a hipótese de que há uma suscetibilidade maior do coração a dano oxidativo causado pela inalação de MP. Além disso, o tecido cardíaco parece ser muito afetado neste modelo de exposição precoce (com 21 dias de idade) ao MP (DAMACENO-RODRIGUES, 2009) e outros tecidos podem ser afetados pela exposição crônica ao MP (ZANCHI et al., 2010, GOETTEMES-FIORIN et al., 2016).

As diferenças observadas entre os estudos podem estar relacionadas no mínimo a 6 fatores: modelo animal escolhido (rato x camundongo), tipo de poluente (ROFA vs MP_{2,5}) e temporalidade da exposição ao poluente (3 dias vs 12 semanas) e período do treinamento (10 semanas em animais adultos vs 12 semanas em animais logo após desmame), método de treinamento (não periodizado vs periodizado) e tempo de coleta de material biológico para análise após último desafio (imediatamente após exercício/MP_{2,5} vs 48 horas após). Mas, fundamentalmente, o efeito protetor do treinamento contra o estresse oxidativo causado pelo MP_{2,5}, observado no trabalho de Petry (2011), não foi observado neste estudo. Tendo em vista que as adaptações antioxidantes do treinamento físico são mais evidentes quando as análises são realizadas após um desafio, e que, em nosso estudo os dados referentes ao estado redox são referentes a um estado de repouso coletados 48 horas após a última sessão de treinamento e exposição ao MP_{2,5}, os benefícios antioxidantes do exercício que poderiam ser mais evidentes se coletado amostras biológicas imediatamente após a última sessão de treinamento, não sendo evidentes em condições basais. Em conjunto, estes dados demonstram que, cronicamente, a exposição ao MP_{2,5} durante o esforço pode representar risco a saúde cardiopulmonar.

As HSPs são geralmente referidas como proteínas de estresse celular, devido à alta expressão proteica destas, verificada diante de uma grande variedade de desafios fisiológicos e ambientais. A resposta celular ao estresse, expressando HSPs, é considerada uma estratégia primitiva e importante na própria evolução das espécies (FEMKE, 2010). Neste sentido, além da expressão de HSPs, a exportação de HSP70 para o ambiente extracelular (eHSP70) é considerado como um sinal de alerta do sistema imunológico (DAVIES, 2006). Portanto, há um crescente interesse em estudar as eHSPs como sendo parte dos “Padrões Moleculares Associados a Dano Celular” (DAMPs, do termo original em inglês *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs)). Ou ainda, as eHSPs podem ser consideradas como causadoras das respostas DAMPs, devido a seu caráter pró-inflamatório, chamada então de DAMPERs. (WILLEM, 2012).

Neste trabalho, os níveis plasmáticos de eHSP72, não foram alterados pelo treinamento moderado ou intenso. Até mesmo, foram observados valores absolutos menores (INT = 0,76 ng/ml) que o grupo sedentário (CON = 1,24 ng/ml), uma diferença de 39%, porém não significativa (P = 0,0826). Tendo as eHSP70 ações pró-inflamatórias, a redução destes valores, acompanhado pela ausência de danos oxidativos neste grupo, sugerem um efeito anti-inflamatório do treinamento físico, mesmo que intenso (PETERSEN, 2005). Além

disso, o plasma dos animais foi coletado 48 horas após a última sessão de treinamento para evitar a interferência de uma resposta aguda do exercício. Ou seja, o treinamento físico *per se*, independente da intensidade, não representou uma situação de alerta imunológico, capaz de gerar um aumento crônico nos níveis de eHSP70, caracterizando estresse físico elevado dos animais (HECK et al, 2011).

Por outro lado, neste trabalho foi observada a resposta celular ao estresse característica (aumento de eHSP72 no plasma para 2,78 ng/ml) induzida pela inalação crônica e de baixas concentrações de MP_{2.5} em camundongos sedentários (grupo MP_{2.5}). O treinamento moderado combinado com a exposição ao MP_{2.5} não influenciou este efeito, mantendo elevadas as concentrações plasmáticas de eHSP72 nos animais (MOD+MP_{2.5} = 2,38 ng/ml) e portanto, mantendo a resposta ao estresse diante da exposição crônica ao MP_{2.5} e apresentando elevados níveis de lipoperoxidação cardíaca. Por outro lado, o treinamento intenso combinado ao MP_{2.5} não apresentou esse aumento nas concentrações de eHSP72 (INT+MP_{2.5} = 1,01ng/ml). Este resultado pode ser interpretado de duas formas: a) O treinamento intenso combinado com MP_{2.5} foi capaz de evitar uma resposta de estresse característica (aumento de eHSP72 pela inalação de MP_{2.5}) o que indicaria um efeito protetor (não obtido pelo treinamento moderado) ou b) o treinamento intenso combinado com MP_{2.5} representa um excesso de desafio a homeostase do organismo, de modo que levou a falência da resposta ao estresse, não aumentando os níveis de eHSP72, representando um risco ao organismo.

No trabalho realizado com sistema de exposição *in vitro*, examinando o tempo de exposição (1, 3, 6, 9, e 24 h após a exposição) e os efeitos sobre células bronquiais expostas a partículas, foi observado que os níveis de eHSP70 aumentaram imediatamente após a exposição de partículas, e este efeito persistiu por várias horas, relacionada a citotoxicidade aumentada em 24h (HAWLEY, 2014). Este efeito já foi observado diante de exposição ao MP_{2.5} *in vivo* porém de forma aguda e em altas concentrações de partículas (BALDISSERA, 2014). No mesmo sentido, um estudo realizado com 144 trabalhadores, sendo 96 que trabalhavam como frentistas (portanto expostos ao MP) e 48 como caixas de posto de gasolina, demonstra que os trabalhadores expostos tiveram indicadores de estresse oxidativo no plasma significativamente diferente em comparação com o grupo controle sendo: diminuição da atividade da SOD e da GPx e aumento de lipoperoxidação plasmática. Além disso, os níveis de eHSP70 plasmático no grupo exposto (2,77±0,64 ng / ml) foi mais elevada do que no grupo de controle (2,32±0,87 ng/ml), sendo que os níveis de eHSP70 foram

inversamente correlacionados com as atividades de SOD ($r = - 0,305$) e GPx ($r = - 0,302$) no grupo exposto ($P < 0,05$) e diretamente proporcionais ($r = 0,653$) aos níveis de MDA no plasma ($P < 0,05$), sugerindo que os níveis plasmáticos de eHSP70 podem ser utilizados como um biomarcador sensível para trabalhadores expostos a poluentes (XIA, 2016). Este conjunto de dados indicam que o treinamento intenso combinado com $MP_{2.5}$ representa um excesso de desafio a homeostase do organismo, de modo que levou a falência da resposta ao estresse, não aumentando os níveis de eHSP72, representando um risco ao organismo, expresso pelo aumento do estresse oxidativo cardiopulmonar.

Por outro lado, a exposição crônica ao $MP_{2.5}$ combinado com outro fator de estresse crônico (ingestão de dieta hiperlipídica) já demonstrou diminuir os níveis plasmáticos de eHSP72 em camundongos de 1,0 ng/ml (Controles) para 0,6 ng/ml, acompanhados de alterações no estado redox cardiopulmonar (SALAMONI, 2014). O treinamento físico, principalmente de alta intensidade, já demonstrou ser capaz de diminuir a exportação de eHSP72 em indivíduos com insuficiência cardíaca, dados relacionados a uma resposta anti-inflamatória e de melhora clínica dos pacientes (ULRICH, 2013). A intensidade do exercício é uma condição que influencia na concentração de eHSP72 e na expressão tecidual de HSP70, sendo que a resposta a um mesmo estímulo é específica para cada tecido. Neste sentido, a alta intensidade de esforço pode apresentar efeito “repressor” sobre a capacidade de adaptação fisiológica (BITTENCOURT, 2012). Assim, o nível de esforço realizado pode ser a justificativa para os níveis reduzidos de eHSP70 observados nos grupos INT e INT+ $MP_{2.5}$. Esses dados indicam que os níveis de eHSP72 mensurados no plasma de camundongos exercitados intensamente podem não representar adequadamente o estresse (oxidativo) que está ocorrendo no sistema cardiopulmonar pelo $MP_{2.5}$, não sendo um biomarcador adequado para este tipo de avaliação, fundamentalmente em combinação com o exercício físico.

Em humanos, alguns estudos indicam ainda a possibilidade de diferenciação de indivíduos quanto à níveis detectáveis e não detectáveis de eHSP72. Um estudo realizado com homens sarcopênicos de idade entre 60 e 75 anos, submetidos a um programa de treinamento de força (musculação) durante 16 semanas, indicou níveis detectáveis de eHSP72 em 47% dos participantes antes do treinamento. Após o treinamento os níveis de eHSP72 diminuíram pela metade e estes resultados foram associados ao aumento da massa muscular. Ou seja, esses dados indicam a diminuição de eHSP72 como um efeito benéfico. Nestes sujeitos os níveis de marcadores inflamatórios clássicos não foram alterados, o que sugere que as alterações nos níveis de eHSP72 (diminuição) podem indicar os efeitos do treinamento físico sobre o

aumento da massa muscular, mas não diretamente sobre outros parâmetros (PERREAUT, 2015). Por outro lado, um estudo transversal que avaliou 140 hipertensos (idade $61 \pm 11,1$ anos) indica que a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT foi maior e os níveis de lipoperoxidação plasmáticos foram menores em hipertensos ativos com eHSP72 plasmática detectável e hipertensos inativos fisicamente e sem eHSP72 detectável têm maior concentração sérica de triglicérides, representando um risco cardiovascular. Esses resultados indicam que os benefícios da atividade física estão relacionados com a presença de eHSP72 no plasma de hipertensos (MARTINS, 2015).

No conjunto de nossos dados, os quais apresentam aumento de lipoperoxidação cardiopulmonar pela combinação entre exercício e $MP_{2,5}$, aumento de eHSP72 em exposição ao $MP_{2,5}$, a ausência desse aumento de eHSP72 justamente no grupo com níveis elevados de lipoperoxidação pode ser interpretado como um prejuízo na resposta celular ao estresse. Esta análise poderá ser futuramente melhor elucidada pela análise da relação entre o conteúdo extracelular e intracelular de HSP70 (eHSP70/iHSP70), pois pode ser um indicativo mais representativo para uso das HSP70 como biomarcadores em situações de exercício (HECK, 2011) e $MP_{2,5}$ (GOETTEMS-FIORIN et al., 2016). Assim, o conjunto de informações da literatura com os nossos dados, indica que a combinação de treinamento e $MP_{2,5}$ oferece risco de estresse oxidativo cardíaco. Este efeito é mais pronunciado na alta intensidade de esforço, na qual o pulmão é também afetado. Sendo a elevação dos níveis de eHSP72 uma resposta natural ao estresse diante da exposição ao $MP_{2,5}$ a ausência desta resposta no grupo INT+ $MP_{2,5}$ concomitante ao estresse oxidativo cardiopulmonar indica uma falência da resposta celular ao estresse e que os níveis de eHSP72 pode não refletir adequadamente o estresse oxidativo cardiopulmonar nesta situação.

CONCLUSÃO

Podemos concluir que o treinamento de intensidade moderada ou alta, associado à exposição ao MP_{2.5}, causou lipoperoxidação cardíaca. O treinamento de alta intensidade associado à exposição ao MP_{2.5} aumentou a lipoperoxidação pulmonar e prejudicou a resposta celular ao estresse, demarcado pelo não aumento na concentração da proteína eHSP72 no plasma. Em conjunto, esses dados indicam que a realização de treinamento físico exposto ao MP_{2.5} oferece risco ao sistema cardiorrespiratório e que esse risco pode ser dependente da intensidade de esforço, podendo não ser detectável pelos níveis de eHSP72 plasmáticos.

Este trabalho indica que pode haver uma intensidade crítica de exercício físico para realização de esforço em ambientes com qualidade do ar inadequada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Methods in Enzymology. **Oxygen Radicals in Biological Systems**.v.105, p. 3-600, 1984.

ALESSIO, H.M. – Exercise-induced oxidative stress. **Medicine and in Sport and Exercise**, v. 25, n. 2, p. 218-224, 1993.

ARBEX, M. A. Abdo et al. Queima de biomassa e efeitos sobre a saúde. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 2, p. 158-175, 2004.

ARBEX, M. A. Abdo et al. A poluição do ar e o sistema respiratório. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v 38, n.5, p. 643-655, 2012.

BALDISSERA, F. G. **Instalação de residual Oil Fly Ash (ROFA) causa aumento de HSP70 e estresse oxidativo no plasma sem alterar estado Redox e resposta ao estresse em tecidos linfóides**. 2014. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 2014.

BARON, Bertrand, Timothy D Noakes, Jeanne Dekerle, Farouck Moullan, Sophie, Robin, Régis Matran and Patrick Pelayo. Why Does Exercise Terminate At The Maximal Lactate Steady State Intensity?. *British Journal Sports Medicine*. 2008.

BITTENCOURT, A. **Efeito de diferentes intensidades de exercício físico sobre a expressão de HSP70: Implicações no metabolismo da glicose e função celular**.2012.54 f. Dissertação de mestrado- Escola Superior de Educação Física (Instituto de ciências básicas da saúde/departamento de fisiologia, Porto Alegre, 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Qualidade do ar**. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/cidades-sustentaveis/qualidade-do-ar>>. Acesso em: 10/01/2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigitel Brasil 2014: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília, 2015.

BUEGE, J.A.; AUST, S. D. Microssomal lipid peroxidation. **Methodos in Enzymoly**, v. 52, p. 302-309, 1978.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BROOK, Robert 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.

CANÇADO, J. E. Delfini et al. Repercussões clínicas da exposição à poluição atmosférica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, supl. 1, p. s5-s11, 2006.

CLANCY, L. et al. Effect of air-pollution control on death rates in Dublin, Ireland: an intervention study. **Lancet**, v. 360, n. 9341, p. 1210-1214, 2002.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 3**, de 28 de junho de 1990.

COSTA BEBER, L. **Consumo de dieta hiperlipídica e exposição ao material particulado fino (mp_{2,5}) em tecidos metabólicos: possíveis implicações no desenvolvimento de diabetes mellitus**. 2015. F. Trabalho de conclusão de curso- UNIJUÍ – Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul Dcvida – Departamento de Ciências da Vida, Ijuí, 2015.

DAMACENO-RODRIGUES, N. R. Effect of pre- and postnatal exposure to urban air pollution on myocardial lipid peroxidation levels in adult mice. **Inhalation Toxicology**, v.1-9, p. 46-64, 2009.

DAMIANI RM et al. Is cardiac tissue more susceptible than lung to oxidative effects induced by chronic nasotropic instillation of residual oil fly ash (ROFA)? **Toxicology mechanisms and methods**; **22**: 533-9, 2012.

DAVIES, EL1, Bacelar MM, Marshall MJ, Johnson E, Wardle TD, Andrew SM, Williams JH. Heat shock proteins form part of a danger signal cascade in response to lipopolysaccharide and GroEL. *Clin Exp Immunol*. Jul;145(1):183-9, 2006

DELFINO, R.J.; STAIMER, N.; VAZIRI, N.D. Air pollution and circulating biomarkers of oxidative stress. **Air Quality Atmosphere and Health**, v.4, p.37–52, 2011.

DE MAIO, A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress observation System: A form of communication during injury, infection, and cell damage. **Cell Stress Chaperones**, v. 16, n. 3, p. 235-249, 2011.

FANHAN, S.C., PAULO, R.L., et al. Effect of air pollution on pediatric respiratory emergency room visits and hospital admissions. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v.38, n. 2, p. 227-235, 2006.

FEMKE, V. W. BERENT, P.- Heat shock proteins: Darwinistic immune modulation on dangerous grounds. *Journal of Leukocyte Biology*, 88, 431-434, 2010.

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n.1, p. 61-68, 2007.

FLECHA, G. B.; Oxidant mechanisms in response to ambient air particles. **Molecular Aspects of Medicine**. MA 022115. p. 169–182, 2004.

GOETTEMS, P. B. F. **Exposição crônica à MP2,5 agrava disfunção metabólica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos**. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 2014.

GOETTEMS-FIORIN PB, GROCHANKE BS, BALDISSERA FG, et al. Fine particulate matter potentiates type 2 diabetes development in high-fat diet-treated mice: stress response and extracellular to intracellular HSP70 ratio analysis. **Journal of Physiology and Biochemistry**, *no prelo*, 2016.

GOBATTO, C. A.; DE MELLO, M. A. R.; SIBUYA, C. Y.; DE AZEVEDO, J. R. M.; DOS SANTOS, L. A. ; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology a Molecular and Integrative Physiology**, n. 130, p. 21-27, 2001.

HAWLEY, B. Time course of bronchial cell inflammation following exposure to diesel particulate matter using a modified EAVES. **Toxicology in Vitro**, n. 28, p.829–837, 2014.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. New York: Oxford, 2007.

HECK, T. G. **Estudo do estresse oxidativo cardiopulmonar e da resposta hemodinâmica em ratos expostos agudamente ao material particulado durante o exercício**. 2007. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Ciências da Saúde, Porto Alegre, 2007.

HECK, T. G. **HSP70 como Marcador de Intensidade de Exercício: Razão entre o Conteúdo Extracelular e Intracelular de HSP70 como um Sinal de Alerta Imunológico**. 2011. 143 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

HECK, T. G. et al. HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain?, **Cell Biochem Funct**, v. 29, p. 215–226, 2011.

HECK, T. G. et al (b). ROFA Instillation Promotes Lung and Heart Oxidative Stress without Hemodynamic Effects in Exercising Rats. **Journal of Exercise Physiology**, v. 17, n. 1, p. 78-79, 2014.

HOFF, C. Immoral and moral uses of animals. **New England Journal of Medicine.**, v. 302, p. 115- 118,1980.

HU, B.; MAYER, M. P.; TOMITA, M. Modeling Hsp70-mediated protein folding. **Bioophysical Journal**, v. 91, n. 2, p. 496-507, 2012.

KARGARFARD, Mehdi, Parinaz Poursafa, Saber Rezanejad, Firouzeh Mousavinasab. Effects of Exercise in Polluted Air on the Aerobic Power, Serum Lactate Level and Cell Blood Count of Active Individuals. **Int J Prev Med**. v. 2, n. 3, p.145–150, 2011.

KRAUSE, M.da S. et al. Physiological concentrations of interleukin-6 directly promote insulin secretion, signal transduction, nitric oxide release, and redox status in a clonal

pancreatic β -cell line and mouse islets. **Journal of clinical Endocrinology**. v. 214, n. 3, p. 301-11, 2015.

KÜNZLI, N. Ambient Air Pollution and Atherosclerosis in Los Angeles. **Environmental Health Perspectives**, v. 113. p. 201-206, 2004.

KÜNZLI N. et al. Traffic-related air pollution correlates with adult-onset asthma among never-smokers. **Thorax**, v. 64, p. 664-670, 2009.

LIN, C.I. Effect of whole-body vibration training on body composition, exercise performance and biochemical responses in middle-aged mice. **Metabolism**, v. 23, p. 342-350, 2015.

MARKLUND S, MARKLUNG G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v.47, p. 469-474, 1974.

MARTINS, E. T. C. **Nível de atividade física e de Ehsp72 plasmática estão associados com a capacidade antioxidante plasmática em hipertensos**. 2015. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Movimento Humano) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

MATTHEWS, J. N. Analysis of serial measurements in medical research. **British Medical Journal**, v.300, p. 230-235, 1990.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Estudo Padrões Qualidade do Ar. (EPA, 2010).

MUKHOPADHYAY, I. et al. Heat shock response: hsp70 in environmental monitoring. **Biochemistry and molecular biology**, v. 17, n. 5, p. 249-54, 2003.

PETERSEN, Anne Marie W., Bente Klarlund Pedersen The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology* Vol. 98 no. 4, 2005.

PETRY, M. R. **Análise dos efeitos pulmonares e cardiovasculares da inalação aguda de Residual Oil Fly Ash em ratos submetidos ao treinamento físico**. 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 2011.

PEREIRA, C.E.L. et al. Ambient particulate air pollution from vehicles promotes lipid peroxidation and inflammatory responses in rat lung. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 10, p. 1353-1359, 2007.

PERREAUL, T K. et al. Sixteen weeks of resistance training decrease plasma heat shock protein 72 (eHSP72) and increase muscle mass without affecting high sensitivity inflammatory markers' levels in sarcopenic men. **American Journal of Physiology** .v.10, p. 15-411, 2015.

POPE 3rd, C. A. et al. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. **Circulation**, v. 109, n. 1, p. 71-77, 2004.

POPE, C.A. et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. **JAMA**, v. 287, n. 9, p. 1132-1141, 2013.

POWERS, S.K.; H. et.al. **Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho**. 3. ed. São Paulo: Manole, cap. 3 e 4, p. 455, 2000.

RABÊLO, L. A. et al. Desbalanço Redox: NADPH oxidase como um alvo terapêutico no manejo cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 5, p. 684-693, 2010.

RADONS, Jürgen. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? **Cell Stress and Chaperones**, v.10, n.12, p.1-26, 2016.

SALAMONI, B. **Efeito da exposição crônica ao material particulado fino nos parâmetros de estresse oxidativo em pulmões de camundongos submetidos ao consumo de dieta hiperlipídica**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 2014.

SANTOS, W. A. et al. Resposta ao exercício físico aeróbico tipo natação sobre o estado oxidativo cardíaco induzido por inalação de fumaça de cigarro em ratos Wistar. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**.v. 13, n.3, p. 355-362, 2014.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.

SMOCK, R.G.; BLACKBURN, M.E.; GIERASCH, L.M. Conserved, disordered C terminus of DnaK enhances cellular survival upon stress and DnaK in vitro chaperone activity. **J Biol Chem**, v. 286, n. 36, p.31821-31829, 2011.

ULBRICH, A. Z. **Influência da intensidade do exercício físico no perfil inflamatório de pacientes com insuficiência cardíaca**.2014. 171f. Tese de doutorado-Universidade do estado de Santa Catarina (Centro de Ciências da Saúde e do Esporte) Programa de Pós Graduação em Ciência do Movimento Humano, Florianópolis/ SC, 2013.

UNITED STATES OF AMERICA. **US Environmental Protection Agency (EPA)**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/>>. Acesso em: 16 fev. 2016.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIÑA, J. et al. Free radical in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. **IUBMB Life**, v. 50, p. 271-277, 2000.

VIEIRA JUNIOR, R. C. et al. Treinamento aeróbico de natação aumenta a atividade de enzimas antioxidantes e o conteúdo de glicogênio no musculoesquelético de ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Exercício e do Esporte**, v.19, n.3, p. 204-208, 2016.

WILLEM, van Eden, Rachel Spiering, Femke Broere, and Ruurd van der Zee. A case of mistaken identity: HSPs are no DAMPs but DAMPERs. *Cell Stress Chaperones*. May; 17(3): 281–292, 2012

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide; Global update 2005; Summary of risk assessment**. Geneva: WHO, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Air Quality Guidelines, global update**. Europe: WHO, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide; Global update 2005; Summary of risk assessment**. Geneva: WHO, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fact Sheet for worldwide prevalence of obesity**.2013. Disponível em: <Availablefrom:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>>. Acesso em: 05/01/2016.

XIA, Bing et al.. Increased oxidative stress and plasma Hsp70 levels among gasoline filling station attendants. **Toxicology and Industrial Health**., jan. 2016. Disponível em: 14 de março de 2016.

XU, X. et al. Effect of early particulate air pollution exposure on obesity in mice. Role of p47phox. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, n. 12, p. 2518-27, 2010.

ZANCHI, A. C. et al. Hippocampus lipid peroxidation induced by residual oil fly ash intranasal instillation versus habituation to the open field. **Inhalation Toxicology**, v.22, n.1, p.84-88, 2010.

ANEXO I – Parecer CEUA



UNIVERSIDADE REGIONAL DO NOROESTE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
Vice-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Rouff, Avenida Itália Km 8, Fone: (51) 3091-1122 - CEP: 91201-900
Registrada pelo Conselho Nacional de Educação nº 1526 de 10/11/1993 - D.O.U. 11/11/1993 e nº 816 de 23/05/1994 - D.O.U. 30/03/1994

Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIJUI CEUA/UNIJUI

PARECER CONSUBSTANCIADO Nº. 011/2013

Protocolo de Pesquisa nº. 009/2013 de 01/10/2013.

Projeto: “HSP70 COMO BIOMARCADOR DO “PONTO CRÍTICO” DA REALIZAÇÃO DE EXERCÍCIO FÍSICO EXPOSTO À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA NO DIABETES”

Finalidade: Pesquisa.

Duração: Início: 06/01/2014- Término: 30/12/2015.

Pesquisador Responsável: Prof. Thiago Gomes Heck

Equipe: Claudia Ramos Rhoden, , Paulo Ivo Homem de Bittencourt Mirna Stela Ludwig, Bethânia Salomoni, Pauline Brendler Goettens, Fernanda Giesel Baldissera, Maicon Machado Sulzbacher, Analu Bender dos Santos, Eloisa Gabriela de Pelegrin Basso, Renan Daniel Bueno Basso e Iberê Kostrycki Machado.

Área do conhecimento: Ciências da Saúde

Cronograma de utilização de Animais:

Data: 06 de Janeiro de 2014

Espécie: *Mus musculus* - B6129SF2/J (B6)

Sexo: Machos

Quantidade: 96 animais

Período da Manutenção do(s) Animai(s): 24 semanas

Data: 04 de Agosto de 2014

Espécie: *Mus musculus* - B6129SF2/J (B6)

Sexo: Machos

Quantidade: 96 animais

Período da Manutenção do(s) Animai(s): 24 semanas

Avaliação do Protocolo de Pesquisa, segundo orientações da Lei Nº 11.794 de outubro de 2008.

Os pesquisadores apresentaram a Comissão de Ética no Uso de Animais UNIJUI, em 14/11/13, o projeto de pesquisa gerado pelo SIE, de acordo com as exigências de documentação necessária para submissão de projetos.



A apresentação da documentação necessária atendeu todas as recomendações do parecer consubstanciado nº 010/2013 da CEUA/UNIJUÍ.

PARECER DO COMITÊ

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, somos de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais das Normas de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão da UNIJUÍ, assim como as responsabilidades do pessoal envolvido no uso de animais da Resolução Normativa Nº1 do CONCEA, de 09 de julho de 2010, descreve no seu artigo 9º Aos pesquisadores, docentes e responsáveis técnicos por atividades experimentais, pedagógicas ou de criação de animais compete:

I – assegurar o cumprimento das normas de criação e uso ético de animais;

II – submeter à CEUA proposta de atividade, especificando os protocolos a serem adotados;

III – apresentar à CEUA, antes do início de qualquer atividade, as informações e a respectiva documentação, na forma e conteúdo definidos nas Resoluções Normativas do CONCEA;

IV – assegurar que as atividades serão iniciadas somente após decisão técnica favorável da CEUA e, quando for o caso, da autorização do CONCEA;

V – solicitar a autorização prévia à CEUA para efetuar qualquer mudança nos protocolos anteriormente aprovados;

VI – assegurar que as equipes técnicas e de apoio envolvidas nas atividades com animais recebam treinamento apropriado e estejam cientes da responsabilidade no trato dos mesmos;

VII – notificar à CEUA as mudanças na equipe técnica;

VIII – comunicar à CEUA, imediatamente, todos os acidentes com animais, relatando as ações saneadoras porventura adotadas;

IX – estabelecer junto à instituição responsável mecanismos para a disponibilidade e a manutenção dos equipamentos e da infra-estrutura de criação e utilização de animais para ensino e pesquisa científica;

X – fornecer à CEUA informações adicionais, quando solicitadas, e atender a eventuais auditorias realizadas.

Solicita-se ao (à) pesquisador (a) o envio a esta CEUA, de relatórios parciais sempre quando houver alguma alteração no projeto, bem como o relatório final.

Ijuí, 20 de novembro de 2013.



Prof. Daniel Curvello de Mendonça Müller
Coordenador da CEUA/UNIJUÍ



ANEXO II – Artigo a ser submetido e normas da revista

1 **ABSTRACT**

2 Exposure to fine particulate matter (PM_{2.5}) air pollution is a risk factor for lung and heart diseases. Inhalation
3 of PM_{2.5} promotes oxidative stress and may induces systemic stress response observed by increased plasma
4 extracellular 72 kDa heat shock proteins (eHSP72) levels, with pro-inflammatory roles. In other hand, regular
5 exercise training can promotes antioxidant and anti-inflammatory benefits. We argue whether the combination
6 of exercise training and PM_{2.5} exposure would be related to modification in oxidative stress profile and stress
7 response, particularly in cardio pulmonary lipid peroxidation and eHSP72 levels. Male mice (n = 32), 30 days
8 old, were randomly divided in 6 treatments for 12 weeks: Control (CON, n = 6), moderate intensity exercise
9 training (MIT, n = 5, periodized swimming exercise training, until 60min, 5x/wk, with additional 4% weight
10 workload), high intensity exercise training (HIT, n = 5, periodized swimming exercise training, until 20min,
11 5x/wk, with additional 8% weight workload), exposed to daily nasotropic instillation of PM_{2.5} (PM_{2.5}, n = 6),
12 and combination of moderate or high intensity training with PM_{2.5} exposure (MIT+PM_{2.5}, n= 5 and HIT+PM_{2.5}
13 n = 5, respectively). Were evaluated: body weight, blood lactate concentration, glycemic profile, heart and lung
14 oxidative stress biomarkers and plasma eHSP72 concentration. We found increased heart lipid peroxidation
15 levels in both exercise plus PM_{2.5} groups (MIT+PM_{2.5} and HIT+PM_{2.5}). HIT+PM_{2.5} also showed an increase in
16 lung lipid peroxidation levels. PM_{2.5} exposure promotes a ~2 fold increase in eHSP72 levels but this effect was
17 not observed in HIT+PM_{2.5} group. We conclude that exercise training and PM_{2.5} exposure combination promotes
18 cardiopulmonary oxidative stress and avoid stress response dependent on exercise intensity.

19

20 **Keywords**

21 Fine particulate matter, exercise, heat shock proteins, oxidative stress

22

23

1 INTRODUCTION

2 Inhalation of fine particulate matter (PM_{2.5}) induces inflammation in the lungs, promoting
3 abnormalities of the epithelial barrier permeability, impaired respiratory function and induces the secretion of
4 pro-inflammatory mediators, as well as lung tissue damage¹⁴. PM_{2.5} can directly translocate into the blood
5 stream and mediated by pulmonary inflammatory response affects autonomic nervous system cardiovascular
6 modulation^{8,36}. Also can deposit on vascular endothelium and promotes inflammation, corroborant
7 atherosclerotic and thrombus formation. Thus lung and heart are high susceptible target organs to PM_{2.5}
8 exposure effects, as showed by lung and cardiac function deterioration⁸. For these effects epidemiological
9 studies have related exposure of PM_{2.5} to an increase in emergency room visit, morbidity and mortality by
10 respiratory and cardiovascular diseases^{5,7}.

11 Several reports have associated PM_{2.5} to induced oxidative stress to adverse effects in the respiratory
12 system^{14,34,35,37}. Also, PM_{2.5} inhalation promotes cardiovascular injuries by direct and/or indirect actions^{6,11,20,36}.
13 Into the bloodstream particles causing systemic inflammation via oxidative stress⁴⁵ and lung reflexes which
14 initiates alterations in autonomic nervous system, increasing heart oxidative stress^{16,36}. Pro-oxidant state of the
15 organism was related with increasing levels of plasma 72 kDa heat shock proteins (eHSP72)^{10,13}. Under
16 stressful conditions (*e.g.* environmental challenges), cells respond by synthesizing and releasing eHSP72, which
17 in the extracellular space the eHSP72 activates pro-inflammatory pathways and is associated to oxidative stress
18 conditions²³ and is correlated to cardiovascular complications and severity of cardiac diseases^{3,22}.

19 Pulmonary damage elicited by particle inhalation is augmented during exercise^{4,15,40-42}, by increasing
20 the deposition in lungs^{38,39}. Additionally, high intensity exercise can be associated to an increase in free radical
21 production and thus to transient oxidative stress¹⁷, related to fatigue¹⁹ and an “open window” for upper
22 respiratory symptoms of infections or lung injury. Also, systemic oxidative stress and inflammation induced by
23 the particles might have a negative impact on cardiovascular function and decrease physical performance⁹.
24 Chronic exposure to outdoor traffic pollution has been suggested to be associated with decreases in physical
25 capacity and increases in risk of abnormal cardiovascular functionality during exercise⁴⁴. In this way, we
26 recently observed that the intratracheal administration of high amount of particles before a moderate intensity
27 exercise session promotes oxidative stress in lung and heart after a swimming exercise rat protocol^{20,21}. Also
28 the eHSP72 release pattern was dependent on exercise intensity and can be related to fatigue¹⁹.

1 Since alterations in oxidative stress and eHSP72 can mark the process of tissue and systemic injury,
2 we used these variables to investigate the effects of combination of regular exercise training and exposure to
3 PM_{2.5}. We hypothesized that exposure to PM_{2.5} affects differently sedentary and trained mice and that the
4 difference can be observed by eHSP72 levels as biomarker of lung and heat oxidative stress.

6 **MATERIALS AND METHODS**

7 **Animals**

8 Male (n=32) 30 days old B6.129SF2/J mice (approximately 18 g), from Animal Facility of Regional
9 University of the Northwestern Rio Grande do Sul State (UNIJUÍ) were kept in semi-metabolic cages, under
10 controlled conditions of temperature (22 ± 2 °C) and light-dark cycles (light from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.). The
11 animals received water and diet *ad libitum*. This protocol was approved by the Animal Ethics Committee of
12 UNIJUÍ (CEUA 011/13).

14 **Experimental Design**

15 The mice were randomly divided in 6 treatments for 12 weeks: Control (CON, n = 6), moderate
16 intensity exercise training (MIT, n = 5, periodized swimming exercise training, until 60min, 5x/wk, with
17 additional 4% weight workload), high intensity exercise training (HIT, n = 5, periodized swimming exercise
18 training, until 20min, 5x/wk, with additional 8% weight workload), exposed to daily nasotropic instillation of
19 PM_{2.5} (PM_{2.5}, n = 6), and combination of moderate or high intensity training with PM_{2.5} exposure (MIT+PM_{2.5},
20 n= 5 and HIT+PM_{2.5} n = 5, respectively).

21 PM_{2.5}, MIT+PM_{2.5} and HIT+PM_{2.5} groups received intranasal instillation of PM_{2.5} (5 µg/10 µL) daily,
22 while Control, MIT and HIT groups received saline solution, for 12 weeks. Experimental design that
23 characterizes the sub-chronic protocol is summarized in table 1. Sub-chronic exposure can be defined as the
24 repeated exposure by inhalation route for more than 30 days up to 90 days, in typically used laboratory animal
25 species.

27 **Characterization of Particulate Matter**

1 The pollutant used in the experiment was PM_{2.5}, collected in polycarbonate filter through a gravimetric
2 collector, on the terrace of the Faculty of Medicine, University of São Paulo (USP) in São Paulo, Brazil, as
3 previously described²⁵. The exposure site was located close to a monitoring station of the State of São Paulo
4 Sanitation Agency. It is estimated that at least 100,000 vehicles circulate daily on the main and lateral street
5 (~83% cars, ~10% diesel vehicles, ~6% motorcycles). There are no industries or significant biomass sources in
6 the surrounding area. Trace element determinations of PM content were carried out by neutron activation
7 analysis and their concentration were expressed by ng per m³ of air, as follows: As, 12.91±0.53; Br, 8.88±0.39;
8 Cl, 8.88±0.39; Co, 1.14±0.04; Fe, 1.15±0.03; La, 2.33±0.29; Mn, 27.5±2.2; Sb, 8.73±0.08; Sc, 0.141±0.009; Th
9 0.351±0.050. Likewise, PM sulfur concentration, determined by X-ray fluorescence analysis, was 1.424±0.08
10 µm/m³. Briefly, after exposure (24 h), the filter was removed and retained particles were obtained by sonication,
11 with ultrasound bath in seven sessions (50 min each) and resuspended in saline solution at a dose of 5 µg/10
12 µL. The process of nasotropic instillation was performed once a day (at 1:00 and 2:00 p.m.), for 12 weeks with
13 an automatic pipette, with 10 µL of solution in the nostril of the animal. This procedure induces apnea reflex
14 promoting the inhalation of the pollutant²⁷.

16 **Body weight, blood lactate and glucose levels**

17 The biometric profile and blood glucose levels of animals were monitored before the randomization,
18 at the 4th, 8th and 12th week. Body weight was checked with semi-analytical scale. Blood glucose levels were
19 monitored after 12 hours of fasting measured by Glucometer Optium Xceed (Abbott) (~5 µL of blood) in a
20 puncture of the distal part of the tail of mice. The results of glycemia were expressed in mg.dL⁻¹ of blood.
21 Caudal venous lactate concentrations (~25 µL of blood) were determined after exercise in the 5th and 9th week
22 by Lactate Analyzer (Accutrend®Plus System, Roche). The results were expressed as mmol·L⁻¹.

24 **Glucose Tolerance Test (GTT)**

25 The glucose tolerance test was performed in the 12th week of intervention in all animals. Food was
26 withdrawn in the night before experiments (12 h before). Glycaemia was measured as described above
27 immediately before and at 30 and 120 min after glucose (1 g/kg in saline solution, *i.p.*) administration. The
28 glycemic response during GTT was evaluated by the IAUC method.

1

2 **Tissue Preparation**

3 At the end of the 12 weeks of intervention, the animals were euthanized. Heart and lungs were
4 dissected, weighed, freeze-clamped in liquid nitrogen and stored for further homogenization. For the analysis
5 of antioxidant activity enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and lipid peroxidation levels.
6 A portion of the tissues was homogenized in potassium phosphate buffer pH 7.4 containing protease inhibitor
7 PMSF (Phenyl-Methyl-Sulfonyl Fluoride, 100 μ M). Afterwards, the homogenates were centrifuged at 1200 x
8 g for 10 min at room temperature and the supernatant fractions were saved for protein determination by the
9 spectrophotometric method Bradford (1976)² of at 595 nm, using bovine serum albumin as standard.

10

11 **Lipid peroxidation**

12 Homogenates were precipitated with 10 % TCA, centrifuged, and incubated with thiobarbituric acid
13 (1:1 V/V) (T5500-Sigma) for 15 minutes at 100°C. TBARS were extracted using butanol (1:1 V/V). After
14 centrifugation, the absorbance of the butanol layer was measured at 535nm. The amount of TBARS formed
15 was expressed in nanomoles of malondialdehyde per milligram of protein (nmol MDA/mg prot).
16 Malondialdehyde standard was prepared from 1,1,3,3,-tetramethoxypropane (Fluka, USA)¹³.

17 **Determination of SOD and CAT Activity**

18 SOD activity was performed by inhibition of auto-oxidation of pyrogallol²⁶. Briefly, in a cuvette, 970
19 μ L of 50 mM Tris/ 1mM EDTA buffer (pH 8.2), 4 μ L of catalase (CAT; 30 μ M) and 10 μ L of homogenate
20 were added and mixed. After, pyrogallol (24 mM in HCl 10 mM) was added and SOD activity determined at
21 25°C in spectrophotometer (420 nm) for 120 s. Results were expressed in units of SOD.mg of protein⁻¹.

22 In a quartz cuvette, 10 μ L of homogenate, 955 μ L of phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) were mixed,
23 and after, 35 μ L of hydrogen peroxide (0.01 M) was added and mixed. The decomposition of hydrogen peroxide
24 by CAT activity was determined at 25°C in spectrophotometer (240 nm) for 120 s. The results were expressed
25 in Units of CAT.mg protein⁻¹.

26

27 **Plasma eHSP72 concentration**

1 A highly sensitive EIA method (EKS-715, Enzo Life Sciences) was used to determine the amount of
2 eHSP72 protein in plasma as previously described¹³. Absorbance was measured at 450 nm, and a standard curve
3 constructed from known dilutions of HSP72 recombinant protein to allow quantitative assessment of eHSP72
4 plasma concentration. Quantification was made using a microplate reader (Mindray MR-96A).

5 6 **Statistical Analysis**

7 Statistical analysis was developed using One-way analysis of variance (ANOVA). Post hoc multiple
8 comparisons among groups were performed with the Tukey's test. All statistical analyzes were performed using
9 GraphPad Prism 6.0 for Windows. The level of significance was set to $P < 0.05$. Results were expressed as mean
10 \pm standard deviation.

11 12 **RESULTS**

13
14 Animals were submitted to a periodized exercise training and was measured its blood lactate
15 concentration to confirm the exercise intensity protocol. In the 5th week, when the animals reach 4% of workload
16 in all exercised groups, the blood lactate concentrations were close to 4.0 mmol/l with no influences of PM_{2.5}
17 exposure (Figure 1A). From 5th week to 9th the MIT e MIT+MP_{2.5} remained with 4% load and increased 10 min
18 per week of exercise until 60 min while HIT e HIT+MP_{2.5} increased 1% per week of workload until 8%, both
19 in the 9th week. At this time, as expected the blood lactate concentration was different in MIT vs HIT groups
20 (Figure 1B). There were no effects of PM_{2.5} exposure on lactate measurements.

21 The body weight (Table 2), fast glycaemia (Table 3) and glucose tolerance test response (Figure 2) of
22 animals were evaluated before the study and on 4th, 8th and 12th week. There were no effects of exercise, PM_{2.5}
23 or combination of exercise plus PM_{2.5} on these variables.

24 We investigated biomarkers of oxidative stress, as CAT and SOD activities and lipid peroxidation
25 levels on heart and lung as way to provide information about exercise and PM_{2.5} combination. There were no
26 differences in CAT and SOD activities in lung and heart tissues (Figure 3A-D). However, MIT+PM_{2.5} e
27 INT+PM_{2.5} presented higher levels of heart lipid peroxidation levels (Figure 3E). Furthermore, MIT+PM_{2.5}
28 presented higher levels of heart lipid peroxidation levels than MIT group (Figure 3E). Lung extracted from
29 HIT+PM_{2.5} group showed the lipid peroxidation levels higher than all other groups (Figure 3F).

1 Plasmatic eHSP72 concentration (Figure 4), a measure for evaluate the heat stress response was not
2 modified in MIT or HIT groups compared to CON group. However, 12 weeks of PM_{2.5} exposure promotes ~2
3 fold increase in eHSP72 levels in sedentary (PM_{2.5} group). This effect was not observed in HIT+PM_{2.5} group.

4 5 **DISCUSSION**

6 This study was based in swimming exercise animal model propose for mice. Swimming is a natural
7 behavior of rodents and when rats are submitted to swimming exercise many physiological, biochemical and
8 molecular responses are able to be measured with a less expensive and simple exercise apparatus³². However,
9 swimming exercise model have some particularities depending on water temperature. Hot (42°C) and cold
10 (20°C) water may promotes hyperthermia and hypothermia in rodents and many authors suggest that 30°C is a
11 good environment for swimmers Wistar rats and mice (for review see ref. ²⁴). Was previously demonstrated
12 that exercise in 30°C water did not increase core temperature in rats. Then any heat shock response modification
13 observed this research was exercise or PM_{2.5} dependent and did not represent a heat stress situation condition.
14 In another words the eHSP72 release modifications can be evaluated as treatments effect. The exercise
15 apparatus, (20cm deep) avoid the jump and dive behavior and allow an energy expend higher than 3 METs and
16 also to avoid stress behavior (dive and freeze) the adaptation period was included in the protocol²⁴. These
17 characteristics are important to confirm the hypothesis that treatments and not a stress condition modulate heat
18 shock response.

19 Blood lactate concentration is a classical intensity marker for exercise experiments, in humans and
20 animal models^{12,18}. In this study the selected workloads was 4 and 8% of body weight attached to the tail. The
21 workloads was increased progressively to promotes better and gradual cardiorespiratory adaptations. MIT
22 groups (4% workload) showed blood lactate concentration close to 4.0 mmol·L⁻¹ after 20 minutes of exercise
23 session and HIT groups higher then 5.5 mmol·L⁻¹. Similar protocol suggests that maximum lactate steady state
24 concentration is close to 5.5 mmol·L⁻¹ observed in 6% workload rats¹² and that 4.89-5.05% of workload
25 represents the load of metabolic transition, as our data. Continuous swimming with 4% attached to the tail the
26 effort may represents 65-70% of VO₂max²⁴. Thus, 8% can represents higher intensity as 90% of VO₂max.
27 Summarizing, this study suggest the follow characteristics to the experimental groups: 4% = moderate intensity
28 and 8% = high intensity exercise training.

1 The majority of experimental studies regarding adverse effects of PM are conducted with rats in resting
2 condition. Previous studies demonstrated that the effect on pulmonary oxidative stress in particles exposure is
3 time dependent. Was observed higher levels of lipid peroxidation in lung tissue in rats exposed to urban particles
4 for 20 continuous hours but, there was no effect in rats exposed for 6 continuous hours or 20 hours intermittently
5 ³⁴. Exposure to urban ambient particles during the 20 minutes of an exercise session results in no modification
6 in the lung lipid peroxidation or catalase enzyme activity when compared to 20 minutes of exercise in filtrated
7 air and 60 minutes of exercise exposed to urban ambient particles showed higher levels of lipid peroxidation in
8 lungs than 20 minutes of exercise in cleaned air²¹. Also, rats treated with ROFA presented an increase in lipid
9 peroxidation levels and a decrease in CAT activity on lung tissue²⁰. In heart, the same study showed an increase
10 in lipid peroxidation levels without modification on catalase activity. This data represented the acute effects of
11 combination of PM_{2.5} and exercise can results in no alteration in antioxidants enzymes but increases lipid
12 peroxidation in heart and lungs, even the tissues were collected 48 hours after the last exercise with PM_{2.5}
13 exposure session.

14 Historically, studies about the effects of exercise on heat shock protein expression have been dedicated
15 to HSP72 analysis in cardiac or skeletal muscle after exhaustive animal protocols ^{19,28,31}. Have been
16 demonstrated that 30 minutes after exercise there are an increase in mRNA expression of muscle inducible form
17 of HSP72. Similar response may be observed in humans, and are related to glycogen depletion and the muscle
18 heating. This acute heat shock response (intracellular HSP72 content) remained increased 24 hours later acute
19 exercise session, in according to exercise load ²⁸.

20 High intensity exercise induced an increase in eHSP72 release by lymphocytes and monocytes¹⁹. Since
21 eHSP72 had been found in the circulation, researchers have commenced to study the correlation between
22 eHSP72 blood levels and the prognosis in patients suffering from several diseases, usually related to oxidative
23 stress. While healthy people usually have low plasma levels of eHSP72, the association of increased blood
24 concentrations of such proteins with illness and disease progression has been hypothesized, including chronic
25 exposure to the air pollutants ⁴⁶. Contrarily, longevity and health have been attributed to low levels of plasma
26 eHSP72⁴³. In this way, oxidative stress, inflammation, cardiovascular disorders and pulmonary fibrosis have
27 been directly correlated with eHSP72 concentration in the bloodstream ³³. These studies suggest that elevation

1 of eHSP72 levels could be an important immunoinflammatory response against physiological disorders as
2 observed in our study in PM_{2.5} group, but not in HIT+PM_{2.5} group.

3 Since HSP72 exist in the extracellular space, molecular interactions with cell surface receptors may
4 occur and signaling pathways could be triggered in many cell types, whereas there are a variety of receptors to
5 HSP70 binding, amplifying the possible targets to these extracellular molecules. Physiologically healthy tissues
6 are supposed to always respond to stress conditions by presenting a strong and convincing heat shock response
7 which involves the expression of intracellularly cytoprotective HSP72^{29,30}. Contrarily, a defective heat shock
8 response, as observed in chronic inflammation-related diseases³⁰. Therefore, the absence of a good eHSP72
9 response, as inferred from high sensitivity ELISA kit in HIT+PM_{2.5} group is an indicative that the 12 weeks of
10 combination of stressful exercise and PM_{2.5} blunts the danger response of organism. In other words, the release
11 of eHSP72 as essential response to environmental stress seems to be preserved in both PM_{2.5}, and MIT+PM_{2.5}
12 groups, which suggest that cardiorespiratory system from that groups are more able than HIT+PM_{2.5} group to
13 arm an efficient response, thus avoiding oxidative stress as observed in our data.

14 15 **Conclusion**

16 Our data support the hypothesis that exercising regularly exposed to fine particulate air pollution may
17 predispose cardiorespiratory system to oxidative stress and this effect was exercise intensity dependent. Also
18 we conclude that combination of exercise training and PM_{2.5} exposure blunts heat shock stress response
19 dependent on exercise intensity. Our data indicates that may have a critical intensity to exercising under
20 inadequately air pollution.

21 22 23 24 **AUTHOR CONTRIBUTION**

25 ASM, ANB and LMS performed biometric and metabolic profile. ABS and LCCB performed experiments on
26 oxidative stress parameters. ABS, TGH performed eHSP2 analyses. All authors were involved in analysing the
27 results. ASM, TGH and MSL co-wrote the paper. TGH and MSL designed the study and provided experimental
28 advice and helped with manuscript revision. All the authors had final approval of the submitted and published
29 versions.

1

2 **ACKNOWLEDGEMENTS**

3 The authors would like to thank to M. Oara, M.M. Sulzbacher, G. Wildner, Y.H. Donato (all from UNIJUI) for
4 their technical support.

5

6 **FINANCIAL SUPPORT**

7 This work was supported by UNIJUI and by grants from Research Support Foundation of the State of Rio
8 Grande do Sul (PqG-2013 - FAPERGS, process: 002106-2551/13-5 to TGH). ABS was recipient of scholarship
9 from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

10

11 **DECLARATION OF INTEREST**

12 The authors declare that they do not have competing financial interests.

Table 1. Experimental protocol of swimming exercise training combined with fine particulate matter exposure

Experimental groups	Periodized swimming exercise training protocols	Fine Particulate Matter (PM_{2.5}) exposition protocol
CON	Mice maintained sedentary: 20min in 30°C shallow water (2 cm), 5x/week, 12 weeks.	Mice received 10 µL of NaCl 0.9% by intranasal instillation daily (7x/week) for 12 weeks
MIT	Mice submitted to moderate intensity swimming training in 20cm deep water (30°C), 5x/week, 12 weeks. Protocol started with 20 min of exercise. In the following weeks the workload increased by additional weight attached in mice: 2 nd week increased to 1% , in 3 rd week increased to 2%, in 4 th week to 3% and 5 th reached 4%. In the following weeks the session duration increased 10min/week up to 60 min with 4% reached in the 9 th week. This workload and duration remained unaltered until 12 th week.	Mice received 10 µL of NaCl 0.9% by intranasal instillation daily (7x/week) for 12 weeks
HIT	Mice submitted to high intensity swimming training in 20cm deep water (30°C), 5x/week, 12 weeks. Protocol started with 20 min of exercise. In the following weeks the workload increased by additional weight attached in mice: 2 nd week increased to 1% , in 3 rd week increased to 2%, in 4 th week to 3% and 5 th reached 4%. In the following weeks the workload increased 1%/week up to 20 min of exercise with 8% weight workload reached in the 9 th week. This workload and duration remained unaltered until 12 th week.	Mice received 10 µL of NaCl 0.9% by intranasal instillation daily (7x/week) for 12 weeks
PM_{2.5}	Mice maintained sedentary: 20min in 30°C shallow water (2 cm), 5x/week, 12 weeks.	Mice received intranasal instillation of PM _{2.5} (5 µg of PM _{2.5} suspended in 10 µL of NaCl 0.9%) daily (7x/week) for 12 weeks
MIT+ PM_{2.5}	Mice submitted to moderate intensity swimming training in 20cm deep water (30°C), 5x/week, 12 weeks. Protocol started with 20 min of exercise. In the following weeks the workload increased by additional weight attached in mice: 2 nd week increased to 1% , in 3 rd week increased to 2%, in 4 th week to 3% and 5 th reached 4%. In the following weeks the session duration increased 10min/week up to 60 min with 4% reached in the 9 th week. This workload and duration remained unaltered until 12 th week.	Mice received intranasal instillation of PM _{2.5} (5 µg of PM _{2.5} suspended in 10 µL of NaCl 0.9%) daily (7x/week) for 12 weeks
HIT+ PM_{2.5}	Mice submitted to high intensity swimming training in 20cm deep water (30°C), 5x/week, 12 weeks. Protocol started with 20 min of exercise. In the following weeks the workload increased by additional weight attached in mice: 2 nd week increased to 1% , in 3 rd week increased to 2%, in 4 th week to 3% and 5 th reached 4%. In the following weeks the workload increased 1%/week up to 20 min of exercise with 8% weight workload reached in the 9 th week. This workload and duration remained unaltered until 12 th week.	Mice received intranasal instillation of PM _{2.5} (5 µg of PM _{2.5} suspended in 10 µL of NaCl 0.9%) daily (7x/week) for 12 weeks

Table 2. Body weight of mice submitted to 12 weeks exercise training combined with PM_{2.5} exposure

	CON	MIT	HIT	PM _{2.5}	MIT +PM _{2.5}	HIT +PM _{2.5}	ANOVA (P Value)
Before	19.0 ± 3.0	18.0 ± 1.8	19.0 ± 1.7	18.5 ± 3.1	17.6 ± 2.3	19.5 ± 2.2	0.825
4th week	24.6 ± 2.2	23.5 ± 2.7	24.9 ± 0.5	24.9 ± 2.1	23.1 ± 2.3	22.2 ± 4.0	0.410
8th week	27.3 ± 1.8	24.7 ± 2.5	25.3 ± 0.9	28.1 ± 2.7	27.1 ± 3.0	25.2 ± 3.9	0.874
12th week	28.0 ± 3.6	26.7 ± 2.2	26.7 ± 2.5	28.7 ± 2.8	27.9 ± 2.9	26.0 ± 3.3	0.772

Body weight (g) expressed in mean ± standard deviation. **CON** = Received 10µl saline daily, maintained sedentary. **MIT** = Trained at moderate intensity. **HIT** = Trained at high intensity **PM_{2.5}** = Received 5µg of PM_{2.5}, maintained sedentary. **MIT+PM_{2.5}** = Trained at moderate intensity receiving 5µg of PM_{2.5}. **HIT+PM_{2.5}** = Trained at high intensity receiving 5µg of PM_{2.5}. (n = 5 - 6 *per* group). One way Anova.

Table 3. Fast glycaemia of mice submitted to 12 weeks exercise training combined with PM_{2.5} exposure

	CON	MIT	HIT	MP _{2.5}	MIT +PM _{2.5}	HIT +PM _{2.5}	ANOVA (P Value)
Before	120.3 ± 6.4	123.6 ± 23.0	127.2 ± 26.2	116.0 ± 22.4	104.8 ± 37.9	119.2 ± 27.4	0.845
4th week	112.5 ± 19.5	96.2 ± 23.9	85.6 ± 13.7	104.8 ± 23.0	104.0 ± 14.8	99.2 ± 16.6	0.330
8th week	102.5 ± 14.7	93.4 ± 14.7	96.0 ± 19.6	94.8 ± 15.2	96.2 ± 15.1	109.4 ± 22.0	0.652
12th week	91.5 ± 21.3	74.0 ± 10.9	80.7 ± 17.0	80.1 ± 8.8	77.2 ± 15.6	81.6 ± 4.0	0.460

Fast glycaemia (mg/dl) expressed in mean ± standard deviation. **CON** = Received 10µl saline daily, maintained sedentary. **MIT** = Trained at moderate intensity. **HIT** = Trained at high intensity **PM_{2.5}** = Received 5µg of PM_{2.5}, maintained sedentary. **MIT+PM_{2.5}** = Trained at moderate intensity receiving 5µg of PM_{2.5}. **HIT+PM_{2.5}** = Trained at high intensity receiving 5µg of PM_{2.5}. (n = 5 - 6 *per* group). One way Anova.

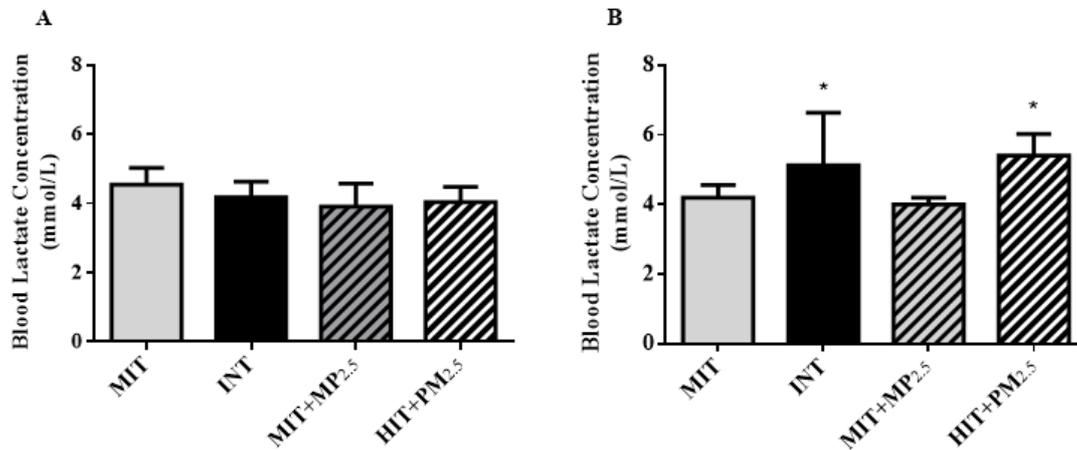


Figure 1. Effects of exercise training combined with fine particulate matter exposure on blood lactate levels. Blood lactate levels (mmol/L) expressed in mean \pm standard deviation. MIT = Trained at moderate intensity. HIT = Trained at high intensity. MIT+PM_{2.5} = Trained at moderate intensity receiving 5 μ g of PM_{2.5}. HIT+PM_{2.5} = Trained at high intensity receiving 5 μ g of PM_{2.5}. (n = 5 - 6 per group). *vs MIT and MIT+PM_{2.5} (P = 0.039) One way Anova and Tukey post hoc test.

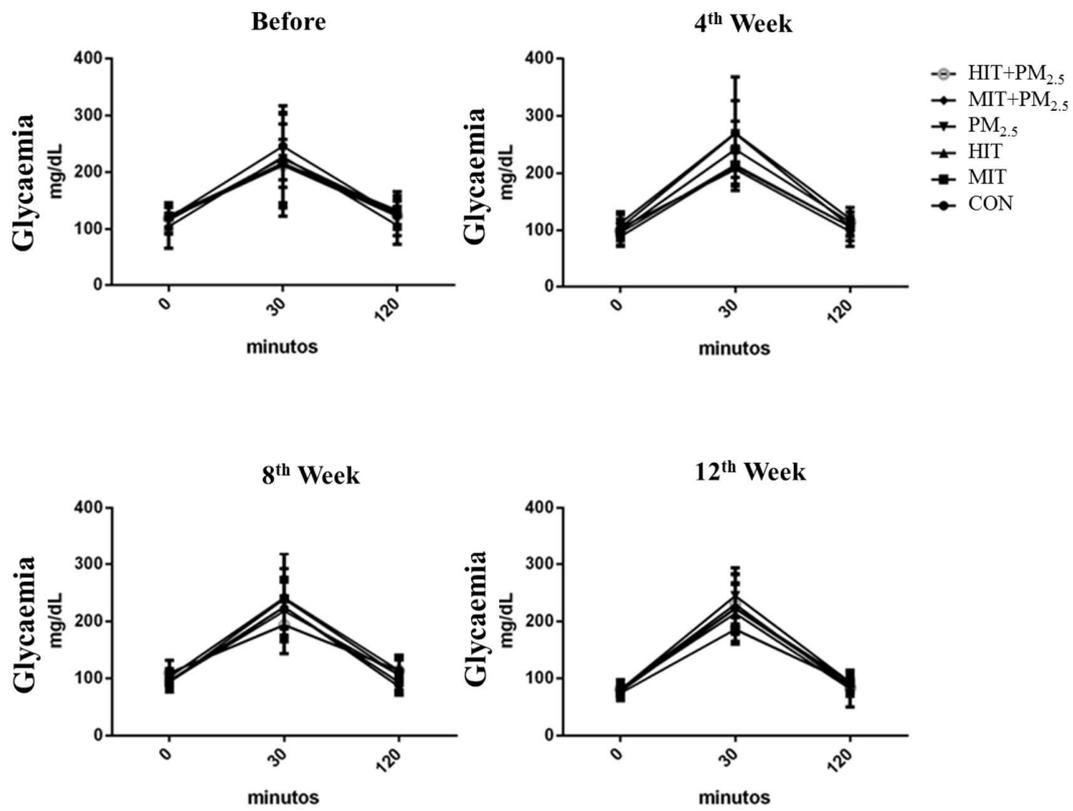


Figure 2. Effect of 12 weeks exercise training combined with PM_{2.5} exposure on Glucose Tolerance Test in mice. Glucose tolerance test (GTT) expressed in mean \pm standard deviation (A) Before experiment (B) 4th week (C) 8th week (D) 12th week. $n=5-6$ per group. $P < 0.05$. One way Anova.

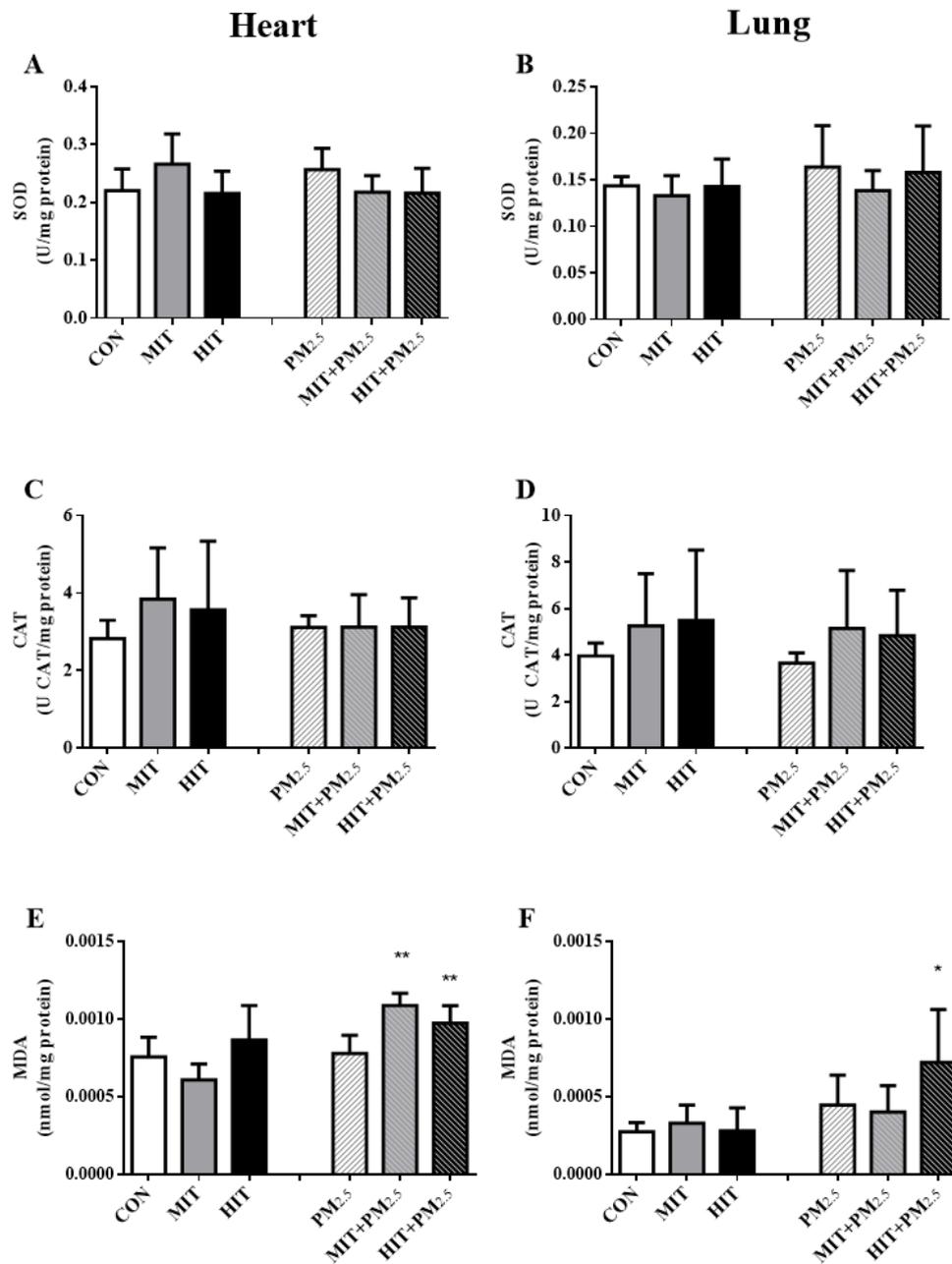


Figure 3. Effect of 12 weeks exercise training combined with PM_{2.5} exposure on oxidative stress profile in mice. Data expressed in mean \pm standard deviation. Superoxide Dismutase activity in Heart (A) and Lung (B). Catalase activity in heart (C) and Lung (D). Lipid peroxidation levels in heart (E) and lung (F). CON = Received 10 μ l saline daily, maintained sedentary. MIT = Trained at moderate intensity. HIT = Trained at high intensity. PM_{2.5} = Received 5 μ g of PM_{2.5}, maintained sedentary. MIT+PM_{2.5} = Trained at moderate intensity receiving 5 μ g of PM_{2.5}. HIT+PM_{2.5} = Trained at high intensity receiving 5 μ g of PM_{2.5}. (n = 4 - 6 *per* group). **vs CON, MIT and PM_{2.5} groups (P = 0.001). *vs All groups (P = 0.014) One way Anova and Tukey post hoc test.

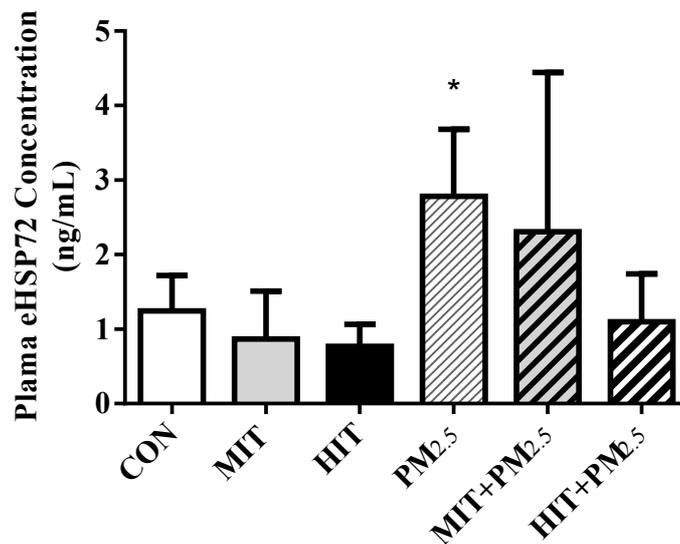


Figure 3. Effect of 12 weeks exercise training combined with PM_{2.5} exposure on plasma eHSP72 concentration in mice. Data expressed in mean \pm standard deviation. CON = Received 10 μ l saline daily, maintained sedentary. MIT = Trained at moderate intensity. HIT = Trained at high intensity PM_{2.5} = Received 5 μ g of PM_{2.5}, maintained sedentary. MIT+PM_{2.5} = Trained at moderate intensity receiving 5 μ g of PM_{2.5}. HIT+PM_{2.5} = Trained at high intensity receiving 5 μ g of PM_{2.5}. (n = 4-6 *per* group). *vs CON, MIT, HIT and HIT+PM_{2.5} (P = 0.031) One way Anova and Tukey post hoc test.

1. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology* 1984; **105**: 121-6.
2. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-54.
3. Cai WF, Zhang XW, Yan HM, et al. Intracellular or extracellular heat shock protein 70 differentially regulates cardiac remodelling in pressure overload mice. *Cardiovasc Res* 2010; **88**: 140-9.
4. Carlisle AJ, Sharp NC. Exercise and outdoor ambient air pollution. *Br J Sports Med* 2001; **35**: 214-22.
5. Dabass A, Talbott EO, Venkat A, et al. Association of exposure to particulate matter (PM_{2.5}) air pollution and biomarkers of cardiovascular disease risk in adult NHANES participants (2001-2008). *International journal of hygiene and environmental health* 2016; **219**: 301-10.
6. Damiani RM, Piva MO, Petry MR, Saldiva PH, Tavares Duarte de Oliveira A, Rhoden CR. Is cardiac tissue more susceptible than lung to oxidative effects induced by chronic nasotropic instillation of residual oil fly ash (ROFA)? *Toxicology mechanisms and methods* 2012; **22**: 533-9.
7. Devlin RB, Smith CB, Schmitt MT, et al. Controlled exposure of humans with metabolic syndrome to concentrated ultrafine ambient particulate matter causes

cardiovascular effects. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2014; **140**: 61-72.

8. Du Y, Xu X, Chu M, Guo Y, Wang J. Air particulate matter and cardiovascular disease: the epidemiological, biomedical and clinical evidence. *Journal of thoracic disease* 2016; **8**: E8-E19.

9. Florida-James G, Donaldson K, Stone V. Athens 2004: the pollution climate and athletic performance. *J Sports Sci* 2004; **22**: 967-80; discussion 80.

10. Gelain DP, de Bittencourt Pasquali MA, C MC, et al. Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis. *Shock* 2011; **35**: 466-70.

11. Ghelfi E, Rhoden CR, Wellenius GA, Lawrence J, Gonzalez-Flecha B. Cardiac oxidative stress and electrophysiological changes in rats exposed to concentrated ambient particles are mediated by TRP-dependent pulmonary reflexes. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2008; **102**: 328-36.

12. Gobatto CA, de Mello MA, Sibuya CY, de Azevedo JR, dos Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001; **130**: 21-7.

13. Goettems-Fiorin PB, Grochanke BS, Baldissera FG, et al. Fine particulate matter potentiates type 2 diabetes development in high-fat diet-treated mice: stress response and extracellular to intracellular HSP70 ratio analysis. *Journal of physiology and biochemistry* 2016.

14. Gonzalez-Flecha B. Oxidant mechanisms in response to ambient air particles. *Molecular aspects of medicine* 2004; **25**: 169-82.

15. Grievink L, Jansen SM, van't Veer P, Brunekreef B. Acute effects of ozone on pulmonary function of cyclists receiving antioxidant supplements. *Occup Environ Med* 1998; **55**: 13-7.

16. Gurgueira SA, Lawrence J, Coull B, Murthy GG, Gonzalez-Flecha B. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environ Health Perspect* 2002; **110**: 749-55.

17. Hatao H, Oh-ishi S, Itoh M, et al. Effects of acute exercise on lung antioxidant enzymes in young and old rats. *Mech Ageing Dev* 2006; **127**: 384-90.

18. Heck H, Mader A, Hess G, Mucke S, Muller R, Hollmann W. Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. *Int J Sports Med* 1985; **6**: 117-30.

19. Heck TG, Scholer CM, de Bittencourt PI. HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? *Cell Biochem Funct* 2011; **29**: 215-26.

20. Heck TG, Nunes RB, Petry MR, et al. Residual Oil Fly Ash (ROFA) Inhalation Promotes Lung and Heart Oxidative Stress without Hemodynamic Effects in Exercising Rats. *Journal of Exercise Physiology online* 2015; **17**: 11.

21. Heck TG, Petry MR, Maslinkiewicz A, et al. Effects of Ambient Particles Inhalation on Lung Oxidative Stress Parameters in Exercising Rats. *Journal of Exercise Physiology online* 2015; **17**: 11.

22. Jenei ZM, Szeplaki G, Merkely B, Karadi I, Zima E, Prohaszka Z. Persistently elevated extracellular HSP70 (HSPA1A) level as an independent prognostic marker in post-cardiac-arrest patients. *Cell Stress Chaperones* 2013; **18**: 447-54.

23. Krause M, Heck TG, Bittencourt A, et al. The chaperone balance hypothesis: the importance of the extracellular to intracellular HSP70 ratio to inflammation-driven type 2 diabetes, the effect of exercise, and the implications for clinical management. *Mediators of inflammation* 2015; **2015**: 249205.

24. Kregel KC, Allen DL, Booth FW, et al. Resource Book for the Animal Exercise Protocols: American physiological Society 2006.
25. Maatz LF, Wood GJ, Rivero DH, Saldiva PH. Tracheal instillation of urban PM(2.5) suspension promotes acute cardiac polarization changes in rats. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 2009; **42**: 207-13.
26. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry / FEBS* 1974; **47**: 469-74.
27. Medeiros N, Jr., Rivero DH, Kasahara DI, et al. Acute pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition. *Environmental research* 2004; **95**: 62-70.
28. Milne KJ, Noble EG. Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. *J Appl Physiol* 2002; **93**: 561-8.
29. Miragem AA, Ludwig MS, Heck TG, et al. Estrogen deprivation does not affect vascular heat shock response in female rats: a comparison with oxidative stress markers. *Mol Cell Biochem* 2015; **407**: 239-49.
30. Newsholme P, de Bittencourt PI, Jr. The fat cell senescence hypothesis: a mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2014; **17**: 295-305.
31. Noble EG, Milne KJ, Melling CW. Heat shock proteins and exercise: a primer. *Appl Physiol Nutr Metab* 2008; **33**: 1050-65.
32. Nunes RB, Tonetto M, Machado N, et al. Physical exercise improves plasmatic levels of IL-10, left ventricular end-diastolic pressure, and muscle lipid peroxidation in chronic heart failure rats. *J Appl Physiol* 2008; **104**: 1641-7.
33. Ogawa F, Shimizu K, Hara T, et al. Serum levels of heat shock protein 70, a biomarker of cellular stress, are elevated in patients with systemic sclerosis: association with fibrosis and vascular damage. *Clin Exp Rheumatol* 2008; **26**: 659-62.
34. Pereira CE, Heck TG, Saldiva PH, Rhoden CR. Ambient particulate air pollution from vehicles promotes lipid peroxidation and inflammatory responses in rat lung. *Braz J Med Biol Res* 2007; **40**: 1353-9.
35. Rhoden CR, Lawrence J, Godleski JJ, Gonzalez-Flecha B. N-acetylcysteine prevents lung inflammation after short-term inhalation exposure to concentrated ambient particles. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2004; **79**: 296-303.
36. Rhoden CR, Wellenius GA, Ghelfi E, Lawrence J, Gonzalez-Flecha B. PM-induced cardiac oxidative stress and dysfunction are mediated by autonomic stimulation. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1725**: 305-13.
37. Rhoden CR, Ghelfi E, Gonzalez-Flecha B. Pulmonary inflammation by ambient air particles is mediated by superoxide anion. *Inhalation toxicology* 2008; **20**: 11-5.
38. Rundell KW, Caviston R. Ultrafine and fine particulate matter inhalation decreases exercise performance in healthy subjects. *J Strength Cond Res* 2008; **22**: 2-5.
39. Rundell KW, Slee JB, Caviston R, Hollenbach AM. Decreased lung function after inhalation of ultrafine and fine particulate matter during exercise is related to decreased total nitrate in exhaled breath condensate. *Inhalation toxicology* 2008; **20**: 1-9.
40. Sharman JE, Cockcroft JR, Coombes JS. Cardiovascular implications of exposure to traffic air pollution during exercise. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 2004; **97**: 637-43.

41. Sharman JE. Clinicians prescribing exercise: is air pollution a hazard? *The Medical journal of Australia* 2005; **182**: 606-7.
42. Sharman JE, Stowasser M. Australian association for exercise and sports science position statement on exercise and hypertension. *Journal of science and medicine in sport / Sports Medicine Australia* 2009; **12**: 252-7.
43. Terry DF, Wyszynski DF, Nolan VG, et al. Serum heat shock protein 70 level as a biomarker of exceptional longevity. *Mech Ageing Dev* 2006; **127**: 862-8.
44. Volpino P, Tomei F, La Valle C, et al. Respiratory and cardiovascular function at rest and during exercise testing in a healthy working population: effects of outdoor traffic air pollution. *Occup Med (Lond)* 2004; **54**: 475-82.
45. Yamawaki H, Iwai N. Mechanisms underlying nano-sized air-pollution-mediated progression of atherosclerosis: carbon black causes cytotoxic injury/inflammation and inhibits cell growth in vascular endothelial cells. *Circ J* 2006; **70**: 129-40.
46. Yang X, Zheng J, Bai Y, et al. Using lymphocyte and plasma Hsp70 as biomarkers for assessing coke oven exposure among steel workers. *Environ Health Perspect* 2007; **115**: 1573-7.

Normas da revista

European Journal of Applied Physiology

Editors-in-Chief: H. Westerblad; K.R. Westerterp

ISSN: 1439-6319 (print version)

ISSN: 1439-6327 (electronic version)

Impact Factor 2.328

Instructions for Authors

Types of papers

The journal publishes Original Articles, Editorials, Invited Reviews, Letters to the Editor, and Replies.

Instructions for submitting Review Proposals, and for the preparation of Invited Reviews can be obtained directly from the Reviews Editors Nigel Taylor (ntaylor@uow.edu.au) and Michael I. Lindinger (mi.lindinger@gmail.com).

Authors of Letters to the Editor find specific guidelines on the link below.

Article Requirements

To facilitate rapid publication manuscripts should be prepared carefully in accordance with the following requirements.

The Conflict of interest is mandatory for all articles types.

Original articles and Invited Reviews should be composed as follows.

- Title page (numbered as page 1)
- Abstract (except for Editorials, Letters to the Editor and Replies)
- Introduction
- Keywords
- Abbreviations
- Methods (also Technique or Case histories)
- Results
- Discussion (comments and comparison with other published results)
- Conclusions
- Acknowledgements
- Conflict of interest
- References

- Tables
- Legends
- Illustrations

Special Issues

- Contributions that are part of a Special Issue must include the following footnote on the title page:
"This article is published as part of the Special Issue on [title of the Special Issue]"

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title page

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusions

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Specific remarks on Abstract

The sections should describe briefly and concisely the background and aim/hypothesis of the investigation, the most important methods, the major results and the conclusions drawn. Major results should be presented quantitatively where appropriate, and changes reported must be expected to be statistically significant (e.g. write "endurance time increased from $a \pm b$ to $c \pm d$ min" and not "endurance time increased ($P < 0.01$)"). The conclusion should highlight the physiological significance of the study and not be a repetition of the results. The abstract should not contain any undefined abbreviations and references may not be cited.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Specific remarks on Abbreviations, Results and Conclusions

Abbreviations

While authors are encouraged to use abbreviations when appropriate, these should be used sparingly and should conform to the convention of the subject area, e.g. for cardiovascular physiology, thermo-physiology and respiratory physiology.

Abbreviations should be defined at first mention in the text and supplied as a list, in alphabetical order, to be included after the keywords, e.g.

Abbreviations:

ANOVA	Analysis of variance
EMG	Electromyography
MU	Motor unit
MVC	Maximal voluntary contraction
RMS	Root mean square
sEMG	Surface electromyography

If there are no abbreviations, state "None" in the Abbreviation list.

Result section

The text in the Results section should be written in a way so that it can be understood by physiologically interested scientists who are not specialists in the particular field of the investigation. Excessive usage of field-specific abbreviations should be avoided. The outcome of statistical analysis should be reported in the text only when it was used to test a specified hypothesis. Detailed descriptions of aspects such as subjects involved in the study, including statistical analyses, are better presented in tables. Authors are encouraged to include as figures original records obtained during experiments, and not simply group-mean responses; for instance, representative original records can often be used to illustrate complex differences between groups.

Conclusions section

Authors should provide concise conclusions to their work and are encouraged to put their results into a wider physiological context. The conclusions must not just be a repetition of the results.

Scientific style

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- Journal article
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- Online document
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- Dissertation
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- [ISSN LTWA](#)

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- [EndNote style \(zip, 2 kB\)](#)

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.
- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant

electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Does Springer provide English language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
 - The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).
 - A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
 - No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
 - No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.
- Important note:** the journal may use software to screen for plagiarism.
- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
 - Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

- Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief’s implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.
- The author's institution may be informed.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

- [here](#):

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving human participants and/or animals

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study. The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

Informed consent

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

- [Springer Open Choice](#)

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

- [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](#)

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.