

FUNDAÇÃO FACULDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE  
PORTO ALEGRE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA  
CLÍNICA

**ESTUDO DO ESTRESSE OXIDATIVO CARDIOPULMONAR E DA  
RESPOSTA HEMODINÂMICA EM RATOS EXPOSTOS  
AGUDAMENTE AO MATERIAL PARTICULADO DURANTE O  
EXERCÍCIO**

Dissertação de Mestrado

Thiago Gomes Heck

Porto Alegre, 2007

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ESTUDO DO ESTRESSE OXIDATIVO CARDIOPULMONAR  
E DA RESPOSTA HEMODINÂMICA EM RATOS EXPOSTOS  
AGUDAMENTE AO MATERIAL PARTICULADO DURANTE  
O EXERCÍCIO

Aluno: Thiago Gomes Heck

Orientadora: Claudia Ramos Rhoden  
Co-Orientador: Pedro Dall'Ago

Área de Concentração: Farmacologia e Terapêutica Clínica

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2007

## DEDICATÓRIA

Sem sombra de dúvida, o esforço gasto durante esta etapa não poderia ser dedicado à outra pessoa se não aquela que me apóia em todos os momentos da vida. Os caminhos do amor e do carinho sempre foram repassados por ela. Portanto, é com esses sentimentos que dedico à minha mãe esta nossa vitória.

## AGRADECIMENTOS

Certamente ninguém conquista seu objetivo sozinho neste mundo. Portanto agradeço todos que, de alguma forma, foram importantes nesta etapa.

À família, pelo apoio inestimável, auxiliando com afeto estes anos de estudo. Especialmente ao meu irmão Cadete Lion, pelos ensinamentos, correções e distrações durante este período. Pelas correções e pela companhia na reta final, agradeço minha namorada Isabele.

Ao professor e grande amigo Alexandre Maslinkiewicz (Baby), que mostrou os valores do caminho da pesquisa e do ensino. Conquistas e épocas de trabalhos em conjunto, sempre serão lembradas.

Ao professor Pedro Dall'Ago, por despertar a curiosidade pela fisiologia no início de minha formação e agora me acompanhar de perto durante os momentos decisivos desta jornada.

Aos meus colegas de laboratório (especialmente os cabeludos Marcelo Petry, Roberto Damiani e a Jéssica Lima) pela ajuda e companheirismo do início até o final deste trabalho.

A Profa. Claudia Ramos Rhoden, por me conceder a oportunidade de realização deste trabalho, pelos ensinamentos que me foi passado e serão de fundamental importância em uma futura atividade docente. Acompanhar o nascimento e crescimento de seu laboratório neste processo de amadurecimento acadêmico, sem dúvida foi uma experiência inigualável.

Aos meus professores, Prof. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr, e Prof. Álvaro Reischak de Oliveira, que sempre me auxiliaram respondendo a qualquer momento uma chamada emergencial, deixando as portas abertas para um novo aprendizado.

Ao companheiro e sempre prestativo Mario Serapião por não deixar os experimentos pararem.

Aos professores desta instituição pelo exemplo e oportunidades durante este período. Especialmente ao professor Ernani Rhoden pelo auxílio nesta reta final.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, especialmente Ivonice Santos e Marcelo Cardoso Fonseca pelo empenho no suporte aos alunos deste curso.

Aos meus colegas de Pós-Graduação que compartilharam desabafos neste trajeto (Maurício Nin, Viviane Toniazo, Ramiro Nunes, Carolina Boettge, Elisa DeLeon, Paula Campagnolo, Fernanda Praia, Ana Zanchi, Carlos Eurico e Gisele Bortolini).

Um abraço especial aos amigos e aos tricolores pelas “comemorações”.

## LISTA DE ABREVIATURAS:

CAT: Catalase

CL: Chemiluminescence

EAO: Espécies ativas de oxigênio

EPA: *Environmental Protection Agency* (EUA)

FC: Frequência cardíaca

GPx: Glutathione Peroxidase

LAC: lactate concentration

LPO: Lipoperoxidação

MDA: Malondialdeído

MP: Material Particulado

PAS: Pressão arterial sistólica

PAD: Pressão arterial diastólica

PAM: Pressão arterial média

PM: Particulate Matter

QL: Quimiluminescência

ROFA: Partículas resultantes da queima de óleo diesel

SOD: Superóxido dismutase

TBARS: Teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

## ABSTRACT

Epidemiological studies have associated particulate matter (PM) exposure with cardiopulmonary damage, responsible for hospital admission and sudden death. Animal studies have shown that oxidative stress is one mechanism involved in lung/heart injuries induced by PM inhalation. Acute physical exercise increases oxygen species production in these organs. The objective of this study was to investigate the cardiopulmonary oxidative stress and hemodynamics parameters during exercise in rats exposed to PM. Methods: the experiments were divided into two steps:

1) The study of the lung oxidative stress in the rats submitted to two models of PM exposure during exercise: exposure to PM in ambient levels “real world” or ROFA (fine particles rich in transition metals) intratracheal instillation. Wistar, adult, male rats were submitted to a moderate intensity physical exercise for 20 or 60 minutes breathing filtered air (F) or PM (P). In addition, four groups of rats received intratracheal instillation of Saline (100 $\mu$ L NaCl 0.9%) or ROFA (500 $\mu$ L/100 $\mu$  NaCl 0.9%) and maintained in resting condition (R-S and R-RF) or were submitted to the swimming exercise for 20 minutes (EX-S and EX-RF). Rats were decapitated and lung was excised to oxidative stress evaluation by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), chemiluminescence (CL) and catalase activity (CAT). Results: the exposure to ambient particles were unable to promote a increase of lipid peroxidation in lung tissue as compared to the animals that received filtered air [TBARS (nmol MDA/mg protein): F20=0.078 $\pm$ 0.021; P20=0.094 $\pm$ 0.04; F60=0.108 $\pm$ 0.04 e P60=0.114 $\pm$ 0.05; CL (cps/mg protein): F20=3970 $\pm$ 772; P20=3345 $\pm$ 465; F60=4727 $\pm$ 850 e P60=4881 $\pm$ 1062; CAT

( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{sec}/\text{mg protein}$ ): F20=0.162 $\pm$ 0.062 P20=0.189 $\pm$ 0.056; F60=0.279 $\pm$ 0.134 e P60=0.219 $\pm$ 0.079 p>0.05]. In addition, we detected that exercise for longer time (60 minutes) produced an increase of lung lipid peroxidation as compared with resting condition groups independently of PM exposure (p<0.05). Regarding the intratracheal instillation protocol, we observed that exercise increased lung oxidative stress, detected by TBARS, CL and CAT measurements (p<0.05). ROFA instillation increased the lung oxidative stress induced by exercise [(TBARS nmol MDA/mg protein): R-S=0.041 $\pm$ 0.008; R-RF=0.066 $\pm$ 0.011 e EX-S=0.054 $\pm$ 0.01 versus EX-RF=0.076 $\pm$ 0.017, p<0.05].

2) The study of heart oxidative stress and hemodynamic parameters in rats submitted to Saline (100 $\mu\text{L}$  NaCl 0.9%) or ROFA (500 $\mu\text{G}/100\mu\text{L}$  NaCl 0.9%) by intratracheal instillation before performed moderate intensity physical activity for 20 minutes. Previously of experiment, one catheter filled was implanted into the carotid artery of all rats for hemodynamic data acquisition during exercise: heart rate (HR), mean arterial pressure (MAP), systolic arterial pressure (SAP) and diastolic arterial pressure (DAP). At the end of 20 minutes of swimming exercise the rats were decapitated and heart was excised to oxidative stress evaluation by TBARS, CL and CAT activity. Results: ROFA treatment increased heart tissue oxidative stress [TBARS (nmol MDA/mg): Saline=0.0289 $\pm$ 0.0063 versus ROFA=0.049 $\pm$ 0.0164, p=0.03; QL (cps/mg protein): Saline=3600 $\pm$ 531 versus ROFA=5202 $\pm$ 951, p=0,015; CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{sec}/\text{mg protein}$ ): Salina=0.031 $\pm$ 0.003 vs ROFA=0.027 $\pm$ 0.003, p=0.087) but these effects were not associated with hemodynamic alterations during short-term and moderate intensity exercise. [HR (beats per minute): Saline=432 $\pm$ 15 vs ROFA=416 $\pm$ 36; MAP (mmHg):



Saline=109.3±9.7 vs ROFA=109±11.4; SAP (mmHg): Saline=127.3±9.7 vs ROFA=128±11; DAP (mmHg): Saline=87.9±8.3vs ROFA=87.3±11.3)]. In conclusion, our studies demonstrated that PM exposure increased cardiopulmonary oxidative stress parameters without hemodynamic alterations.

Keywords: Oxidative stress, Air pollution, particulate matter, exercise, heart and lung.

## RESUMO

Estudos epidemiológicos têm associado à exposição ao material particulado (MP) com comprometimento do sistema cardiorrespiratório, sendo este responsável pelo aumento do número de internações hospitalares e de mortes súbitas. Estudos em modelos animais apontam o estresse oxidativo como um dos mecanismos responsáveis pelos danos pulmonares e/ou cardíaco induzidos pela exposição a este poluente. Além disso, a demanda energética gerada por uma sessão de exercício físico promove aumento da produção de espécies ativas de oxigênio nos tecidos supra-citados. Nosso estudo teve como objetivo investigar os parâmetros oxidativos cardiopulmonares e a função hemodinâmica durante uma sessão de exercício físico em ratos expostos ao MP. Para tanto dividimos o nosso estudo em duas etapas:

1) Estudo do efeito do MP sobre o estresse oxidativo pulmonar em ratos submetidos a dois modelos de exposição: - em nível ambiental (“real world”) ou - instilação intra-traqueal de “residual oil fly ash” (ROFA – partícula fina rica em metais de transição). Ratos, Wistar, machos, adultos realizaram exercício de natação de intensidade moderada por 20 ou 60 minutos na presença (P20 e P60) ou não (F20 e F60) de MP em níveis ambientais. Outro grupo de ratos foi subdividido em 4 grupos: Grupo 1:R-S: recebeu 100µl de NaCl 0,9% por instilação intra-traqueal e permaneceu em repouso; Grupo 2:R-RF: recebeu 500µg/100µl de suspensão de ROFA via intra-traqueal e permaneceu em repouso; Grupo 3: EX-S recebeu 100µl de NaCl 0,9% por instilação intra-traqueal e foi submetido a natação de intensidade moderada por 20

minutos e Grupo 4: EX-RF: recebeu 500µg/100µl de suspensão de ROFA via intra-traqueal e foi submetido a natação de intensidade moderada por 20 minutos. Após os experimentos, em ambos os modelos, os ratos foram eutanasiados e foi realizada a retirada do pulmão para avaliação dos parâmetros oxidativos através do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), quimiluminescência (QL) e atividade da catalase (CAT). Os resultados mostraram que a exposição ao MP em nível ambiental não resultou em aumento significativo do estresse oxidativo pulmonar em ratos submetidos a natação de intensidade moderada [TBARS (nmol MDA/mg proteína): F20=0,078±0,021; P20=0,094±0,04; F60=0,108±0,04 e P60=0,114±0,05; p=0,164; QL (cps/mg proteína): F20=3970±772; P20=3345±465; F60=4727±850 e P60=4881±1062; CAT (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/seg/mg proteína) F20=0,162±0,062 P20=0,189±0,056; F60=0,279±0,134 e P60=0,219±0,079 p>0,05]. Entretanto, verificamos que os animais exercitados por 60 minutos apresentaram aumento da lipoperoxidação pulmonar quando comparados aos animais que realizaram exercício por 20 minutos, independente da condição ou não de exercício (p<0,05). Em relação ao protocolo de instilação intra-traqueal de ROFA, observamos, através da determinação do TBARS, QL e CAT que o exercício aumentou o estresse oxidativo pulmonar de ratos (p<0,05). Além disso, detectamos que o poluente promoveu um aumento do estresse oxidativo pulmonar, exacerbando o efeito do exercício (TBARS nmol MDA/mg proteína: R-S=0,041±0,008; R-RF=0,066±0,011 e EX-S=0,054±0,01 versus EX-RF=0,076±0,017, p<0,05).

2) Estudo do efeito do MP sobre o estresse oxidativo cardíaco e alterações hemodinâmicas de ratos submetidos a instilação intra-traqueal de “residual oil fly ash”-ROFA. A artéria carótida de ratos Wistar, machos, adultos foi canulada para registro dos

parâmetros hemodinâmicos: frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD). Estes animais foram submetidos à administração via intra-traqueal de solução fisiológica (grupo Salina= 100µl NaCl 0,9%) ou suspensão de ROFA (grupo ROFA= 500µg/100µl NaCl 0,9%) e imediatamente submetidos ao exercício de natação de intensidade moderada durante 20 minutos com simultâneo registro hemodinâmico. Ao término do experimento os ratos foram eutanasiados e foi realizada a retirada do coração para avaliação dos parâmetros oxidativos: TBARS, QL e atividade da CAT. Resultados: o tratamento com ROFA aumentou o estresse oxidativo do coração durante o exercício. [TBARS (nmol MDA/mg proteína): Salina= 0,0289±0,0063 vs ROFA=0,049±0,0164, p=0,03; QL (cps/mg proteína): Salina=3600±531 vs ROFA=5202±951, p=0,015; CAT (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/seg/mg proteína): Salina=0,031±0,003 vs ROFA=0,027±0,003, p=0,087). Em relação aos parâmetros hemodinâmicos não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas [FC (batimentos por minuto): Salina=432±15 vs ROFA=416±36; PAM (mmHg): Salina=109,3±9.7 vs ROFA=109±11,4; PAS (mmHg): Salina=127,3±9.7 vs ROFA=128±11; PAD (mmHg): Salina=87,9±8.3 vs ROFA=87,3±11,3, p>0,05].

Em conclusão, nossos resultados demonstraram que a exposição ao MP promoveu um aumento do estresse oxidativo cardiopulmonar em ratos exercitados sem causar alterações dos parâmetros hemodinâmicos.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Região de deposição das partículas inaladas de acordo com seu diâmetro aerodinâmico. (A) Alvéolos, (TB) Traquéia e Brônquios e (NFL) Nariz, Faringe e Laringe. (Adaptado de MARCONI, 2003) .....	23
Figura 2. Mecanismos de formação de EAO no coração em resposta a inalação de material particulado. (adaptado de GONZALEZ-FLECHA, 2004).....	26
Figura 3. Mecanismos de formação de espécies ativas de oxigênio (EAO) no pulmão em resposta a inalação de material particulado. (adaptado de GONZALEZ-FLECHA, 2004) .....	26
Figura 4. Distribuição eletrônica nas espécies ativas de oxigênio (EAO) mostrando apenas os elétrons dos orbitais $\pi$ externos. ....	32
Figura 5. Representação esquemática das etapas da lipoperoxidação de membranas celulares. ....	43
Figura 6. Algumas doenças humanas relacionadas com excessiva produção de espécies ativas de oxigênio (Adaptado de PINCEMAIL, 1995).....	49
Figura 7. Hipótese de produção de espécies ativas de oxigênio (EAO) pelo exercício realizado com concentrações inadequadas de material particulado e suas implicações ...	61
Tabela 1: Padrões Nacionais de Qualidade do Ar, através da resolução n.º 03 de 28/06/1990, CONAMA	17
Tabela 2 - Critérios para episódios críticos de poluição do ar .....	18
Tabela 3. Espécies ativas de oxigênio.....	35

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	15
1.1 POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA – GENERALIDADES.....	15
1.1.2 MATERIAL PARTICULADO – FORMAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO.....	20
1.1.3 MATERIAL PARTICULADO – EFEITOS BIOLÓGICOS.....	22
1.1.4 MATERIAL PARTICULADO – MÉTODOS DE EXPOSIÇÃO.....	30
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO.....	31
1.2.1 FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO.....	31
1.2.2 MECANISMOS ANTIOXIDANTES.....	36
1.2.3 DANOS CAUSADOS POR ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO.....	41
1.2.4 DOENÇAS RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO.....	46
1.3 EXERCÍCIO.....	50
1.3.1 EXERCÍCIO FÍSICO E ESTRESSE OXIDATIVO.....	52
1.3.2 TREINAMENTO FÍSICO E ESTRESSE OXIDATIVO.....	56
1.4 EXERCÍCIO FÍSICO E POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA.....	59
2. OBJETIVO GERAL.....	63
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
4. ARTIGO 1.....	76
5. ARTIGO 2.....	101
6. CONCLUSÕES.....	127

## INTRODUÇÃO

### 1.1 POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA – GENERALIDADES

A terminologia poluente diz respeito a substâncias químicas que excedem as concentrações naturais e causam efeitos adversos nos seres vivos e/ou no ecossistema. Dessa forma, a poluição atmosférica envolve qualquer alteração qualitativa ou quantitativa da constituição normal da atmosfera suficiente para produzir um efeito mensurável sobre o homem, outros animais, vegetais e minerais (OGA, 1996). Produtos emitidos diretamente pelas fontes poluidoras são chamados de poluentes primários enquanto os que resultam de sua transformação são poluentes secundários. Segundo a *Environmental Protection Agency* (EPA, 1996), os principais poluentes da atmosfera são os óxidos de enxofre, monóxido de carbono, óxidos de nitrogênio, hidrocarbonetos, ozônio e o material particulado (MP).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Programa Ambiental Norte Americano têm afirmado que a poluição atmosférica por MP representa o mais grave problema global de poluição do ar nos dias de hoje. Entre as 20 maiores megacidades (aquelas com população acima de 10 milhões de habitantes), 12 delas apresentam sérios problemas de poluição por MP, o qual se encontra persistentemente acima dos índices preconizados pela OMS (GOMES, 2002).

Acidentes que comprometeram a qualidade do ar, como o do Vale do Meuse (França) em 1930, o de Donora (EUA) em 1948 e o de Londres em 1952, permitiram a associação entre elevação da poluição atmosférica e ações deletérias à saúde, principalmente sobre o aparelho respiratório, inclusive com aumento na mortalidade (WILLIAMS, 2004). Esses fatos levaram os governos de vários países a estabelecerem programas de controle da poluição atmosférica, como o britânico *Air Pollution Control Act of London* de 1956, o norte-americano *Clean Air Act Amendments* de 1970 o qual serviu como base para o *National Ambient Air Quality Standards* (AAQS), e o Europeu *Air Quality Guidelines for Europe* (EPA, 1996; HAUCK et al, 1998; WHO, 2000). Dessa forma, programas de monitoramento da qualidade do ar já fazem parte da realidade de algumas das principais cidades industrializadas do mundo (GODLESKI & CLARKE, 1998).

O padrão americano de qualidade do ar para concentrações de  $MP_{10}$ , ficou mais rigoroso no ano de 2005, passando o limite permitido de  $150\mu\text{g}/\text{m}^3$  em média durante 24 horas para  $50\mu\text{g}/\text{m}^3$ , e de  $50\mu\text{g}/\text{m}^3$  em média durante o período de um ano para  $20\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Quando consideramos o  $MP_{2,5}$ , o padrão estabelecido para concentrações deste passou de  $65\mu\text{g}/\text{m}^3$  para média do período de 24 horas e  $15\mu\text{g}/\text{m}^3$  durante o período e de um ano, para 25 e  $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ , respectivamente (WHO, 2005). O Brasil segue os mesmos valores estabelecidos para  $MP_{10}$ , durante 24 horas e para o período de um ano, sendo adicionado um padrão de qualidade do ar de  $240\mu\text{g}/\text{m}^3$  para 24 horas e  $80\mu\text{g}/\text{m}^3$  para um ano de medida das concentrações de partículas totais. Não há padrão estabelecido para  $PM_{2,5}$ .



Em Porto Alegre, o índice de qualidade do ar é avaliado e divulgado pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler - RS (FEPAM), seguindo os parâmetros estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), demonstrado na Tabela 1. Os padrões primários referem-se a 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. Os secundários são 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 à 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.

**Tabela 1. Padrões Nacionais de Qualidade do Ar (Resolução n.º 03 de 28/06/1990, CONAMA)**

Poluente	Tempo de Amostragem	Padrão Primário ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	Padrão Secundário ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
Partículas Totais em Suspensão (PTS)	24 horas*	240	150
	MGA**	80	60
Partículas Inaláveis (PI)	24 horas*	150	150
	MAA***	50	50

\* Não deve ser excedido mais que uma vez ao ano. \*\* Média geométrica anual.  
\*\*\* Média aritmética anual.

Essa resolução do CONAMA também estabelece critérios para episódios críticos de poluição do ar, nos quais temos a presença de altas concentrações de poluentes na atmosfera em curto período de tempo, como resultante da ocorrência de condições meteorológicas desfavoráveis à dispersão dos mesmos. Ficam estabelecidos os níveis de atenção, alerta e emergência (Tabela 2).

**Tabela 2. Critérios para episódios críticos de poluição do ar**

Poluente	Atenção	Alerta	Emergência
Partículas Totais em Suspensão (PTS) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ – 24 horas	375	625	875
Partículas Inaláveis (PI) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ – 24 horas	250	420	500

O estabelecimento de padrões de qualidade de ar em grandes cidades tem contribuído para realização de estimativas que auxiliam na administração das mesmas no que diz respeito às questões ambientais. Bell *et al.* (2006), ao avaliar as cidades Santiago (Chile), São Paulo (Brasil) e Cidade do México (México), estimam que uma política de redução de emissão de poluentes pode evitar 156.000 mortes, 4 milhões de ataques de asma, 300.000 atendimentos a crianças e 48.000 casos de bronquite crônica em um período de 20 anos (2000-2020). Na Cidade do México, entre os anos de 1997 e 2003, a média das concentrações de  $\text{MP}_{10}$  foi de  $60,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , já em São Paulo foi de  $49,02 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Na cidade do México, os níveis de  $\text{MP}_{10}$  excederam os padrões em 112 dias em 1995 e

apenas 5 dias em 2002. Em Santiago, os níveis de  $MP_{10}$  diminuíram de  $108\mu\text{g}/\text{m}^3$  (1990) para  $82\mu\text{g}/\text{m}^3$  (1998), enquanto o  $MP_{2,5}$  diminuiu de  $65\mu\text{g}/\text{m}^3$  para  $39\mu\text{g}/\text{m}^3$  no mesmo período (CIFUENTES *et al.*, 2005).

A economia também é afetada pela poluição atmosférica, pois se estimam 8 milhões de ausências no trabalho devido a problemas de saúde referentes à exposição a poluentes em grandes centros urbanos da América Latina (BELL *et al.*, 2006). Medidas efetivas para remoção de poluentes estão sendo implantadas nas principais cidades e incluem áreas de reflorestamento e parques. Embora eficientes, áreas arborizadas geram gastos em torno de US\$ 10.000 por tonelada de  $MP_{10}$  removida, enquanto controles relacionados aos combustíveis veiculares custam entre US\$ 25.000 e US\$ 50.000 (ESCOBEDO *et al.*, 2007).

### 1.1.2 MATERIAL PARTICULADO – FORMAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

O MP consiste em qualquer tipo de partícula sólida ou líquida muito pequena invisível a olho nu. Sua composição e propriedades químicas são extremamente variáveis. Segundo Kelly & Sandström (2004), 40% das partículas existentes no ar, menores que 10 $\mu$ m, são provenientes da exaustão de partículas de diesel, da poeira carregada pelos ventos, da queima de madeira, das estradas não pavimentadas e também dos resíduos industriais. No entanto, há uma variabilidade nas fontes emissoras em diferentes cidades. Na Cidade do México (México), 40% da emissão de partículas menores que 10 $\mu$ m são oriundos do setor de transporte, enquanto que em Santiago (Chile) os valores atribuídos são de 86%. (O'RYAN & LARRAGUIBEL, 2000 *apud* BELL *et al.*, 2006). A poluição pelos meios de transporte é exacerbada pelo aumento constante da frota de veículos, longo período de utilização destes, manutenção inadequada e tráfego congestionado (BELL *et al.*, 2006).

Além de ser proveniente de fontes diretas, o MP também pode ser formado indiretamente quando gases provenientes da combustão reagem com a luz solar e vapor de água. Em grandes quantidades, o MP pode formar pequenas nuvens de poluição que diminuem a visibilidade em diversas cidades, principalmente durante períodos de inversão térmica (ZIELINSKA, 2005) Nos primeiros 10 quilômetros da atmosfera, normalmente o ar vai se resfriando à medida que nos distanciamos da superfície da terra. Assim, o ar mais próximo à superfície, que é mais quente, portanto mais leve, pode ascender, favorecendo a dispersão dos poluentes emitidos pelas fontes. A inversão térmica é uma condição meteorológica que ocorre quando uma camada de ar quente

sobrepõe-se a uma camada de ar frio, impedindo o movimento ascendente do ar, uma vez que o ar abaixo dessa camada fica mais frio, portanto mais pesado, fazendo com que os poluentes se mantenham próximos da superfície. As inversões térmicas são fenômenos meteorológicos que ocorrem durante todo o ano, sendo que no inverno elas são mais baixas e mais frequentes, principalmente no período noturno. Em ambientes com grande número de indústrias e de circulação de veículos, como o das cidades, a inversão térmica pode levar a alta concentração de poluentes, podendo ocasionar problemas de saúde (OGA, 1996).

O deslocamento das partículas na atmosfera pode ocorrer de modo horizontal e vertical simultaneamente (ZIELINSKA, 2005). As concentrações de metais, adsorvidos a MP podem diminuir de 4 a 22 vezes à medida que se afasta de um centro onde transitam diariamente 20 a 25mil veículos (ZIEMACKI *et al.*, 2003).

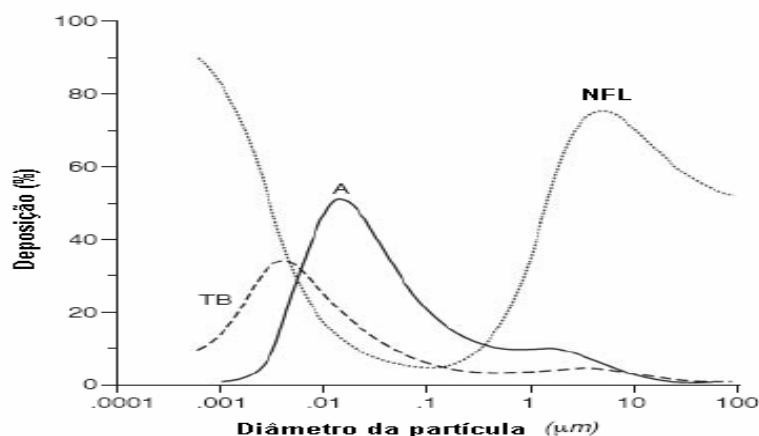
Classificam-se partículas de acordo com seu diâmetro aerodinâmico: em ultrafinas ( $MP_{0,1}$ ) que têm diâmetro menor que  $0,1\mu m$ , partículas finas com diâmetro entre  $0,1$  e  $2,5\mu m$  ( $MP_{2,5}$ ) e partículas com diâmetro entre  $2,5$  e  $10\mu m$  são chamadas de partículas grosseiras ( $MP_{10}$ ). Embora partículas menores que  $30\mu m$  possam ser inaladas e absorvidas, e partículas maiores possam causar contaminação do solo ou da água (OGA, 1996), partículas com diâmetro menor que  $10\mu m$  têm maior relevância em relação à influência no sistema respiratório. (SMITH & THIER, 1981).

### 1.1.3 MATERIAL PARTICULADO – EFEITOS BIOLÓGICOS

O destino das partículas inaladas depende do seu comportamento aerodinâmico, além dos fatores anatômicos e fisiológicos. As propriedades dinâmicas das partículas aéreas, por sua vez, dependem da sua dimensão, forma, densidade, inércia, difusão e composição química, sendo que a deposição do MP é devido à impactação inercial, à sedimentação gravitacional e aos movimentos brownianos (ZIELINSKA, 2005). Quanto à inércia, partículas inaladas movem-se rapidamente pelo interior das vias aéreas. A tendência da partícula se mover na mesma direção é considerada inércia, que pode aumentar conforme a velocidade da entrada do ar (CARLISLE & SHARP, 2001). Essa característica resulta em maior deposição nas vias aéreas superiores, podendo ser incrementada com o aumento da frequência respiratória. A sedimentação das partículas depende da densidade das mesmas, e quanto mais lenta e profunda for a respiração, maior a sedimentação. A difusão das partículas através dos movimentos brownianos é uma característica considerada apenas nas unidades respiratórias terminais, onde a massa de ar em movimento é baixa. A difusão dos gases é muito mais rápida do que das partículas, no entanto considera-se relevante a difusão de partículas menores que  $0,5\mu\text{m}$ .

Assim, a deposição de partículas ao longo das vias aéreas depende de seu diâmetro aerodinâmico (MARCONI, 2003) (Figura 1). Enquanto partículas maiores que  $10\mu\text{m}$  raramente ultrapassam a cavidade nasal, partículas de  $1\mu\text{m}$  dificilmente são retidas nessa região. Já partículas com  $2\mu\text{m}$  apresentam pico de deposição na região alveolar. No entanto, estas características são idealizadas desconsiderando a composição das

partículas, pois materiais mais solúveis rapidamente entram na corrente sanguínea, podendo atingir outros órgãos, enquanto as menos solúveis se depositam e podem causar lesões epiteliais e atuar sobre vários receptores (HAUCK, 1998; GOMES, 2002). Desse modo, a inalação, deposição e absorção de MP podem afetar o aparelho respiratório e atingir a circulação sistêmica distribuindo-se para outros órgãos, como o coração (GOMES, 2002).



**Figura 1. Região de deposição das partículas inaladas de acordo com seu diâmetro aerodinâmico. (A) Alvéolos, (TB) Traquéia e Brônquios e (NFL) Nariz, Faringe e Laringe. (Adaptado de MARCONI, 2003)**

Associação entre exposição a diferentes concentrações de MP e alteração da função respiratória e cardiovascular, vem sendo demonstrada em estudos epidemiológicos. Essa associação torna-se mais evidente em indivíduos particularmente suscetíveis como crianças (NASCIMENTO *et al*, 2006; DELFINO *et al*, 2004; TIMONEN *et al*, 2002; FREITAS *et al.*, 2004, SALDIVA *et al.*, 1994; CANÇADO, *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2006; FARHAT *et al.*, 2005), idosos (CANÇADO, *et*

*al.*, 2006; FREITAS *et al.*, 2004; DEVLIN *et al.*, 2003; SALDIVA *et al.*, 1995), gestantes (GOUVEIA *et al.*, 2004), ou indivíduos com doenças cardíacas (IBALD-MULLI *et al.*, 2004; KLOT *et al.*, 2005; ZANOBETTI *et al.*, 2004; LAGORIO *et al.*, 2003; PEKKANEN *et al.*, 2002) e/ou pulmonares (ZEKA *et al.*, 2006; LAGORIO *et al.*, 2006; LAGORIO *et al.*, 2003).

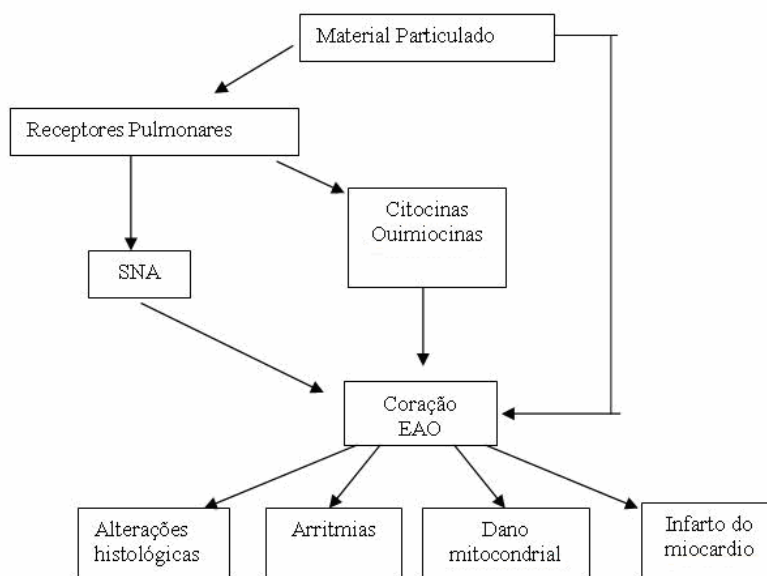
A análise da função expiratória pulmonar é capaz de avaliar a influência dos níveis de MP sobre o trato respiratório. Os indivíduos expostos a esse poluente apresentam diminuição do volume expiratório forçado em um segundo, diminuição da capacidade vital forçada e do pico de fluxo expiratório, afetando principalmente indivíduos asmáticos (TURNOVSKA *et al.*, 2007; DELFINO *et al.*, 2004; LAGORIO *et al.*, 2003; PENTTINEN *et al.*, 2001; TIMONEN *et al.*, 2002; GRIEVINK *et al.*, 1998). Dentre os mecanismos relacionados à disfunção cardiovascular (TURNOVSKA *et al.*, 2007) está o aumento da frequência cardíaca (LAGORIO *et al.*, 2003), a diminuição da variabilidade da frequência cardíaca (SANTOS *et al.*, 2005; DEVLIN *et al.*, 2003; GOLD *et al.*, 2000; IBALD-MULLI *et al.*, 2004; LAGORIO *et al.*, 2003) a alteração na pressão arterial (SANTOS *et al.*, 2005; ZANOBETTI *et al.*, 2004; IBALD-MULLI *et al.*, 2004; VOLPINO *et al.*, 2004) e a indução de eventos arrítmicos e isquêmicos cardíacos (VOLPINO *et al.*, 2004; PEKKANEN *et al.*, 2002; ZAREBA *et al.*, 2001). A ação do MP sobre o sistema cardiopulmonar pode ser também demonstrada pelo aumento da resposta inflamatória pulmonar (SOUKUP & BECKER, 2001) e circulatória (SULLIVAN *et al.*, 2007; SALVI *et al.*, 1999). A inalação de MP resulta em alterações na relação entre o sistema pulmonar e circulatório, demonstrada pela queda na saturação da hemoglobina pelo oxigênio (VOLPINO *et al.*, 2004; DeMEO *et al.*, 2004). Devido a



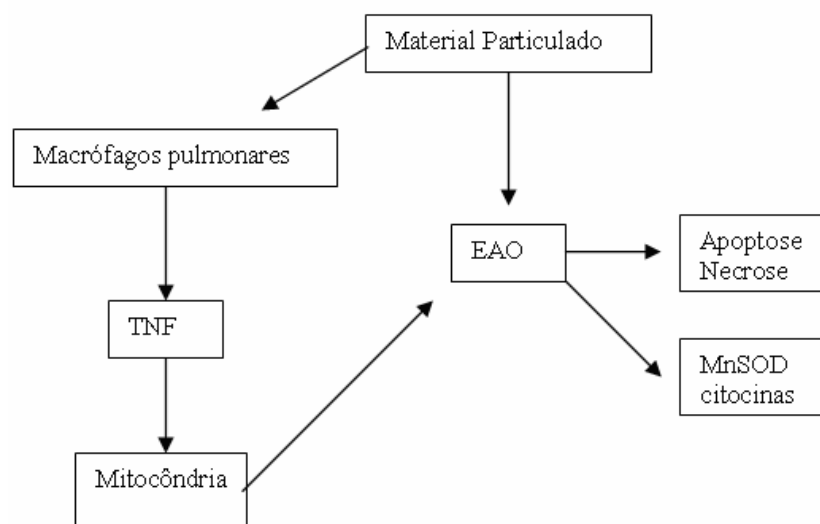
tantas evidências, a *American Heart Association* emitiu um posicionamento oficial sobre a associação entre poluição atmosférica e doenças cardiovasculares (BROOK *et al.*, 2004).

O risco à saúde associado à inalação de MP, também é devido ao seu potencial de adsorção de metais, gases tóxicos como óxidos de nitrogênio ou de enxofre, ou até mesmo microorganismos, conferindo as partículas características toxicológicas diferentes, de acordo com sua fonte. Após a inalação, esses componentes podem ser carregados até os alvéolos juntamente com o MP, causando danos significativos. Segundo Kelly & Sandström (2004), partículas do ar carregam metais redox ativos, que através de reações químicas colaboram para formação de processos oxidativos no pulmão.

Efeitos tóxicos podem ocorrer não só em nível local como sistêmico. Gonzalez-Flecha (2004) sugere a existência de dois mecanismos responsáveis pela toxicidade ao sistema cardiopulmonar proveniente da inalação de MP: 1) mecanismo direto, causado pelas próprias partículas e seus componentes adsorvidos; 2) mecanismos indiretos, relacionados com a indução de mediadores pró-inflamatórios e/ou desbalanço do sistema nervoso autônomo. Uma característica comum a ambos é a capacidade de induzir a produção de espécies ativas de oxigênio (EAO). Nas figuras 2 e 3, são demonstrados os mecanismos de formação de EAO no coração e no pulmão, respectivamente.



**Figura 2. Mecanismos de formação de espécies ativas de oxigênio no coração em resposta a inalação de material particulado. (adaptado de GONZALEZ-FLECHA, 2004)**



**Figura 3. Mecanismos de formação de espécies ativas de oxigênio no pulmão em resposta a inalação de material particulado. (adaptado de GONZALEZ-FLECHA, 2004).**

As respostas inflamatórias são mais dependentes do tipo de metal inalado do que da concentração total de poluentes no ar. A composição e, conseqüentemente, os efeitos biológicos da inalação de partículas se diferem de acordo com sua fonte emissora e estação climática em que foi produzida (SEAGRAVE *et al.*, 2006). Diferentes metais podem ter diferentes efeitos no organismo, variando no tempo de resposta inflamatória (imediatos ou tardios) e/ou na duração da mesma (rápida ou prolongada) (RICE *et al.*, 2001). Nesse sentido, foi verificada uma correlação positiva entre a exposição ao manganês, ferro, cobre e zinco e o aumento de estresse oxidativo no pulmão. Resultado similar foi encontrado entre a exposição ao alumínio, silício, titânio ou ferro, e a resposta oxidativa do coração (GURGUEIRA *et al.*, 2002).

Mais detalhadamente, deve-se ressaltar que macrófagos pulmonares constituem a primeira linha de defesa em resposta à inalação de poluentes. Esses macrófagos produzem uma variedade de mediadores pró-inflamatórios e antiinflamatórios quando estimulados por um agente externo. Entre estes mediadores estão citocinas, fatores de crescimento (principalmente o fator de necrose tumoral alfa, TNF- $\alpha$ ) e derivados do ácido araquidônico (IMRICH *et al.*, 2007). Embora a formação de EAO, por esses mediadores, seja necessária para a defesa do organismo, as EAO podem causar danos secundários ao tecido. Alguns estudos (GONZALEZ-FLECHA, 2004; GHIO *et al.*, 2002) sugerem que o estresse oxidativo é capaz de aumentar a expressão de neutrófilos quimiotáticos contribuindo para inflamação pulmonar aguda ou crônica. Estudos *in vivo*, mostram que MP aumenta a produção de citocinas e quimiocinas, injúria pulmonar e migração de neutrófilos. *In vitro*, MP afeta os macrófagos alveolares, as células epiteliais

(MAZZARELLA *et al.*, 2007; AUGER *et al.*, 2006; DYE *et al.*, 1999) e os neutrófilos (AAM & FONUNNUM, 2007), demonstrando relação com os estudos de estresse oxidativo causado por MP *in vivo* (PINHO *et al.*, 2005; PINHO *et al.* 2004; MUDWAY *et al.*, 2004; TAO *et al.*, 2003; GHIO *et al.*, 2001).

A relação entre o aumento da lipoperoxidação (LPO) e exposição a MP foi também demonstrada por Sánchez-Rodríguez *et al.* (2005). Esses autores demonstraram que indivíduos que vivem na Cidade do México, sabidamente com níveis de qualidade do ar inadequados, apresentaram 50% mais LPO plasmática quando comparados aos indivíduos de cidades vizinhas.

A inalação de MP gera reflexos vasoconstritores nas vias aéreas, iniciados por terminações nervosas livres na narina e nos brônquios, conduzidos por fibras aferentes e eferentes do nervo vago. Esse reflexo é passível de bloqueio por atropina, evidenciando uma resposta do sistema parassimpático. Esta resposta é demonstrada por uma típica curva dose resposta de efeito constritor devido à inalação de partículas (WHIPP & WASSERMAN 1991). Os mecanismos oxidativos propostos por Gonzalez-Flecha (2004) são baseados em trabalhos experimentais de seu grupo. Rhoden *et al.* (2005) demonstraram a participação dos sistemas simpático e parassimpático na formação de danos oxidativos gerados pela inalação de MP. Nesse sentido, Gurgueira *et al.* (2002) demonstraram que houve aumento na quimiluminescência do pulmão e coração de ratos expostos ao concentrador de partículas. Também foram demonstradas respostas diferentes, conforme o órgão considerado, de forma que no pulmão houve aumento de oxidação após três horas de exposição, enquanto no coração este efeito apareceu apenas após cinco horas de exposição. Em trabalho subsequente, foi demonstrado por Rhoden *et*

*al.* (2004) que o tratamento com N-acetilcisteína pode prevenir a inflamação pulmonar induzida pela exposição por cinco horas ao concentrado de partículas à poluição, indicando a participação direta de mecanismos oxidativos em danos pulmonares induzidos por MP.

O perfil de enzimas antioxidantes também é modificado pela inalação de concentrado de partículas. Gurgueira, *et al.* (2002) demonstraram aumento da atividade de enzimas importantes no aparato antioxidante, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), no pulmão e coração, sendo que essa adaptação é tecido específica: no pulmão foi encontrado um aumento na indução (70%) para Mn-SOD (a isoforma mitocondrial de SOD). A CuZnSOD (isoforma citosólica) não apresentou alterações enquanto a CAT aumentou em 30%. No coração, Cu/ZnSOD aumentou em 100%, Mn-SOD, 40% e CAT, 20%,

Considerando a hipótese da participação de oxidantes na toxicidade de MP, PEREIRA (2006) demonstrou que ratos expostos à inalação de MP por vinte horas na cidade de Porto Alegre apresentaram aumento de LPO pulmonar e aumento da resposta inflamatória bronco alveolar.

Em resumo, a inalação de MP resulta em eventos complexos de toxicidade: estimulação de receptores pulmonares e células do sistema imune; produção de EAO e indução de mediadores pró-inflamatórios que podem transformar efeitos locais (inflamação pulmonar, obstrução da vias aéreas) em efeitos sistêmicos (disfunção cardíaca, alterações no SNA, alteração na coagulação sanguínea).

#### 1.1.4 MATERIAL PARTICULADO – MÉTODOS DE EXPOSIÇÃO

O método mais fidedigno para testar as hipóteses relacionadas aos mecanismos pelos quais o MP causa seus efeitos biológicos seria a exposição controlada de indivíduos. No entanto, esses estudos normalmente envolvem um pequeno número de pessoas e são limitados por razões éticas óbvias. Do mesmo modo, biópsias pulmonares são raramente possíveis para uma melhor avaliação. O uso de experimentos com animais possibilita um estudo mais minucioso sobre os mecanismos de toxicidade do MP (GERDE, 2005). O modelo de inalação de partículas, através de aerosol ou de fluxo contínuo de ar, é o modelo que melhor mimetiza a exposição ao MP em níveis urbanos. O modelo de instilação via nasal ou intratraqueal torna-se uma alternativa mais prática e permite estabelecer relações entre a dose-efeito, a quantidade de MP instilado e os efeitos biológicos mensurados. Estudos com exposição *in vitro* são alternativas interessantes sob o ponto de vista de avaliar uma resposta específica a um dado tipo celular. É importante salientar que cada método possui vantagens e desvantagens. O método mais realista normalmente demonstra efeitos biológicos menos pronunciados, mas explora as condições de exposição em que a população se encontra, sujeita a alterações diárias/horárias conforme a temperatura, ventos, umidade e tráfego de veículos. Métodos alternativos com dose estabelecida de partículas permitem uma avaliação mais completa da toxicocinética e da toxicodinâmica envolvida (SEAGRAVE *et al.*, 2005).

## 1.2 ESTRESSE OXIDATIVO

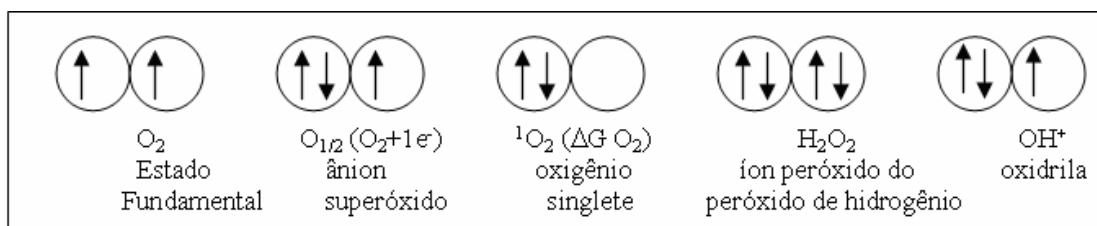
### 1.2.1 FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO

No processo respiratório tem-se, sempre, seja em maior ou menor escala, a formação de espécies intermediárias de oxigênio, com potencial citotóxico, chamados de EAO. O metabolismo dos seres aeróbios está então de posse de um paradoxo vital: a imprescindibilidade do  $O_2$  para manutenção da vida e, por outro lado, seu potencial de toxicidade diante de vias oxidativas no processo respiratório mitocondrial. Em órgãos onde a atividade metabólica é mais intensa, verifica-se uma maior população mitocondrial. Em geral, cerca de 20% do volume citoplasmático é ocupado pelas mitocôndrias.

Através da cadeia de elétrons mitocondrial, o oxigênio deve sofrer uma redução tetraeletrônica (estável), catalisada pela citocromo-oxidase. É essa enzima que condiciona a reação a ocorrer em uma única etapa, sem formação de intermediários, devido ao seu potencial redutor (POWERS & HOWLEY, 2000). No entanto, isso ocorre com 95% do oxigênio molecular, e os 5% restantes são reduzidos formando, então, as chamadas EAO ou radicais livres. O escape de  $O_2$  desta rota origina as EAO, pois fora dela dão-se comumente as reduções monoeletrônicas, ou seja, reduções incompletas do oxigênio.

O termo radical livre designa um átomo ou grupo de átomos com um elétron desemparelhado, isto é, um elétron ímpar em sua órbita mais externa (Figura 4), o que

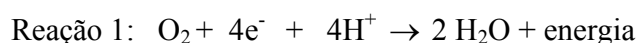
lhe confere um caráter altamente reativo e com um tempo de vida incrivelmente fugaz, da ordem de milésimos de segundo.



**Figura 4. Distribuição eletrônica nas espécies ativas de oxigênio (EAO) mostrando apenas os elétrons dos orbitais π externos.**

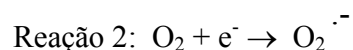
A formação desses compostos é estabelecida pela perda ou ganho de um elétron, como, por exemplo, na fissão homolítica de uma ligação covalente, em que cada um dos átomos fica com um elétron desemparelhado. Cabe ressaltar que, embora o oxigênio molecular no estado fundamental seja um bi-radical, sua reatividade é baixa, por que seus dois elétrons desemparelhados têm spins paralelos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Em razão de sua configuração eletrônica, o oxigênio tem uma forte tendência a receber um elétron de cada vez. A conversão univalente do oxigênio a água processa-se da seguinte maneira:





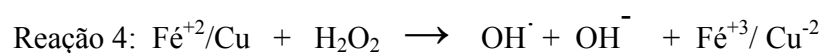
A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental gera a formação do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).



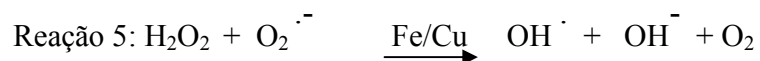
O superóxido, ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio, forma o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) através do processo chamado dismutação. Esta reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) encontrada em quantidades elevadas nas células dos mamíferos e que acelera a velocidade da reação em 10.000 vezes quando comparada com a dismutação espontânea em um pH fisiológico.



Quando o peróxido de hidrogênio recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, é formado o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), o mais reativo dos intermediários, pois reage e altera qualquer estrutura celular que esteja próxima e, assim, influencia enzimas, membranas ou ácidos nucleicos. O radical hidroxil pode ser formado, também, quando o peróxido de hidrogênio reage com íons ferro ou cobre (reação de Fenton).



Os íons de metais de transição podem, também, catalisar a reação entre o peróxido de hidrogênio e o superóxido, o que resulta na produção do radical hidroxil (reação de Haber-Weiss).



Os radicais superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e hidroxil ( $\text{OH}^\cdot$ ) apresentam elétrons desemparelhados na sua órbita mais externa e são, portanto, chamados radicais livres. O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) não é um radical livre, pois representa um metabólito do oxigênio parcialmente reduzido. Outras espécies de interesse são os oxigênios *singlet*, que são formas de oxigênio spin alterada. Estes metabólitos derivados do oxigênio são denominados EAO em função de sua grande reatividade para biomoléculas e, em geral, alternam o tamanho e a forma dos compostos com os quais os mesmos interagem.

Além disso, o radical superóxido pode reagir diretamente com o óxido nítrico (NO), um radical livre centrado no nitrogênio, gerando peroxinitrito. Este pode levar à formação de um oxidante com características do radical hidroxil.



Em resumo, o metabolismo do oxigênio é capaz de formar EAO, sendo ou não espécies radicalares (Tabela 3).

**Tabela 3. Espécies ativas de oxigênio**

Radicais livres		Não radicais	
Superóxido	$O_2^{\cdot -}$	Peróxido de hidrogênio	$H_2 O_2$
Hidroxil	$OH^{\cdot}$	Ácido hipocloroso	$HOCl$
Peroxil	$RO_2^{\cdot}$	Ozônio	$O_3$
Alcoxil	$RO^{\cdot}$	Peroxinitrito	$ONOO^-$
Hidroxil	$HO_2^{\cdot}$		

### 1.2.2 MECANISMOS ANTIOXIDANTES

Desde que a vida aeróbia se tornou possível, os organismos necessitaram de dispositivos biológicos que lhes permitissem lidar com a toxicidade do O<sub>2</sub>. As providências adotadas deram-se pela elaboração de sistemas enzimáticos e não enzimáticos que podem agir como *scavenger* (varredores), formando a partir de EAO produtos menos tóxicos, ou como *quencher* (absorvendo a energia de excitação destes radicais, neutralizando-os).

Os antioxidantes biológicos podem exibir dois modos de ação distintos contra as EAO, atuando como inibidores da síntese de EAO ou como inativadores das espécies já formadas.

A inativação das espécies já formadas é o processo antioxidante mais usual, seja através da catálise enzimática ou por combinação desta com *scavengers*, compostos altamente hábeis em liberar de sua molécula elétrons ou átomos completos de hidrogênio, estabilizando, prontamente, as EAO.

O aumento da capacidade enzimática para metabolizar O<sub>2</sub> é, invariavelmente, acompanhado do aumento das enzimas especializadas que desativam as EAO. O aparato enzimático antioxidante celular é constituído basicamente por três enzimas: superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) (JI, 1999).

A SOD é o maior sistema de defesa em células aeróbias, combatendo os efeitos tóxicos do oxigênio. Ela pode ter localização intra e extracelular. A enzima localizada no citosol das células eucarióticas contém o cobre e o zinco em seu sítio ativo (CuZn-SOD)

e a localizada na matriz mitocondrial contém manganês (Mn-SOD). A SOD extracelular também possui o cobre e o zinco no seu sítio ativo, porém seu peso molecular é maior em relação ao da citosólica. Esse complexo enzimático catalisa a dismutação do radical  $O_2^{\cdot -}$  para formar  $H_2O_2$  e oxigênio (reação 3).

A CAT é uma hemoproteína com atividade peroxidase específica para  $H_2O_2$  localizada, principalmente, em organelas intracelulares como os peroxissomos, cuja função é a remoção do  $H_2O_2$  no meio (reação 7). Encontra-se, amplamente, distribuída em órgãos como o fígado, os rins e em baixas concentrações no cérebro.



A GPx tem ação peroxidásica inespecífica para  $H_2O_2$ , podendo ou não utilizar selênio como co-fator. Apresenta intensa atividade no fígado e nos eritrócitos, moderada no coração, rins e pulmões e baixa nos músculos. Esta enzima é a principal envolvida na remoção de  $H_2O_2$  do cérebro, a qual oxida a glutathiona reduzida (GSH). Esta é um tiol de baixo peso molecular, encontrado no citoplasma e corresponde à maior reserva de cisteína. A GPx mais o NADPH pode reduzir peróxidos lipídicos, radicais livres e  $H_2O_2$ . A GSH é convertida em dissulfeto de glutathiona (GSSG) que é reconvertida a GSH pela glutathiona redutase.

A exposição de animais a concentrações aumentadas de  $O_2$  frequentemente aumenta a atividade da SOD, CAT e GPX em muitos tecidos, o que significa que a quantidade presente normalmente é suficiente somente para equilibrar as taxas normais

de produção das EAO e, assim, preservar a integridade celular (RAHMAN, 2005; GIANNERINI *et al.*, 2001; BEJMA *et al.*, 2000)

Os sistemas não enzimáticos podem ser divididos em hidrofóbicos, hidrofílicos e estruturais. Os ácidos graxos poliinsaturados das membranas lipídicas compõem a região hidrofóbica das células. O  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e os  $\beta$ -carotenos (vitamina A), presentes nas membranas celulares fornecem átomos de hidrogênio e podem prevenir as reações de peroxidação propagadas em cadeia nas mesmas, evitando a desestruturação da arquitetura celular (SEN & PACKER, 2000; JI, 1999). Podem atuar, também, como *quencher* de espécies excitadas, agindo na etapa de terminação da LPO. Os carotenóides são compostos isoprenóides amplamente distribuídos na natureza, onde desempenham um importante papel protetor das células e dos organismos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Por outro lado, os sistemas hidrofílicos são representados por substâncias químicas que agem impedindo as reações dos radicais livres nos meios iônicos e aquosos dos compartimentos celulares. O ácido ascórbico, a cisteína e a glutathiona reduzida, a ceruloplasmina, a transferrina, o triptofano e a histidina são os principais representantes, agindo, principalmente, no controle da produção do radical  $\text{OH}\cdot$  (DEL MAESTRO, 1980).

O colesterol, intercalado no interior das membranas, pelo seu tamanho e estrutura é o principal representante dos sistemas estruturais, podendo proteger os ácidos graxos da lesão peroxidativa. O  $\alpha$ -tocoferol também é considerado um antioxidante estrutural, por

se intercalar nas membranas celulares. A localização de certos peroxissomos e mitocôndrias, com seus mecanismos especializados de *scavengers*, parecem ter papel importante no controle de reações causadas pelos radicais livres (DEL MAESTRO, 1980).

A vitamina A tem ação de *quencher* de oxigênio *singlet*. A vitamina C, a albumina e a n-acetilcisteína são *scavengers* de EAO. A vitamina E tem ação antioxidante bloqueando canais para as substâncias lipossolúveis, tendo participação, também, na regeneração de GSH e do ácido ascórbico, substâncias também com caráter antioxidante (PINCEMAIL, 1995).

Pode-se dizer que um organismo encontra-se sob estresse oxidativo, quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (SIES, 1997). Tendo em vista que as células do corpo humano vivem em constante atividade devido à predominância do metabolismo oxidativo, pode-se considerar que durante atividades amenas ou mesmo durante o metabolismo basal, o corpo humano trabalha sob uma normalidade oxidativa. Este estado basal consiste em formação de EAO em torno de 5% do volume de O<sub>2</sub> admitidos à intimidade celular que são reduzidos de forma incompleta por outros sistemas enzimáticos, que não o da citocromo-oxidase. Dentro desses parâmetros, identificam-se dois tipos de estresse oxidativo: o basal e o estimulado. Quando é imposta à célula uma sobrecarga de solicitação, instala-se o estimulado, ou seja, aumenta o nível de estresse já constante nesse sistema. Portanto, ao referir-se ao estresse oxidativo, descrevem-se níveis

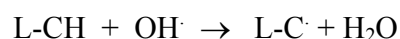
acima do metabolismo basal (respostas metabólicas ao esforço, por exemplo), porém, não necessariamente, em níveis patológicos imediatos.



### 1.2.3 DANOS CAUSADOS POR ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO

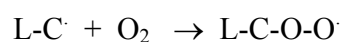
A LPO é uma reação em cadeia que ocorre na membrana celular e pode ser dividida em três etapas:

Iniciação: provavelmente o radical hidroxil ou oxigênio *singlet* – espécies com spins antiparalelos – reagem abstraindo um átomo de hidrogênio de um grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-) da cadeia lateral de um ácido graxo poliinsaturado (AGPI) formando um radical centrado no carbono. Os hidrogênios ligados aos carbonos metilenos são univalentes, portanto mais reativos.

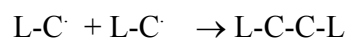


Onde L representa a continuação da cadeia do ácido graxo.

Propagação: este radical centrado no carbono (L-C), por sua vez, reage com o oxigênio produzindo radicais peroxil, os quais propagam a reação.



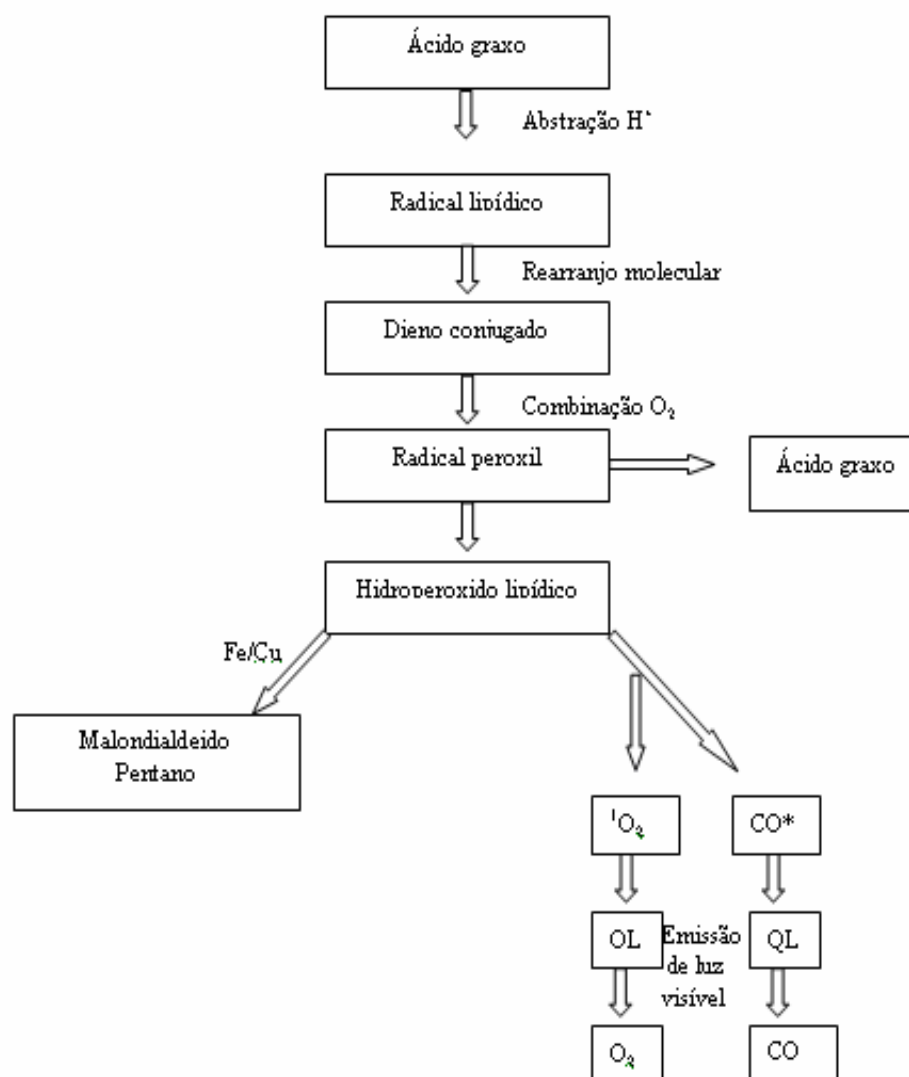
Terminação: ocorre quando dois radicais reagem entre si



A LPO pode alterar a permeabilidade das membranas, induzindo a formação de poros hidrofílicos. Os produtos da degradação podem se difundir do local das reações e dar origem ao edema celular, às alterações da permeabilidade vascular, à inflamação e à

quimiotaxia, bem como causar a polimerização das proteínas de membrana. (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A fim de mensurar o dano oxidativo lipídico, pode-se quantificar os produtos da LPO, como o malondialdeído (MDA), os hidrocarbonetos voláteis (gases etano e pentano), os aldeídos saturados, insaturados e as cetonas. Alguns produtos podem, ainda, reagir entre si, formando um tetróxido instável que, decomposto, dá origem a dois oxigênios *singlet* e uma carbonila excitada. Estas espécies excitadas retornam ao seu estado fundamental emitindo luz visível. Esse processo é conhecido por quimiluminescência (IWAOKA *et al.*, 1987; BOVERIS *et al.*, 1981) e constitui-se num importante método indireto de quantificação de LPO (Figura 5).



**Figura 5. Representação esquemática das etapas da lipoperoxidação de membranas celulares.**  $^1\text{O}_2$  = oxigênio singlete e  $\text{CO}^*$  = carbonila excitada (Adaptado de DEL MAESTRO, 1980). Além da QL muitas técnicas estão disponíveis para medir a taxa de peroxidação dos lipídios, dentre elas o TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) para medir aldeídos (entre eles o MDA), a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). É importante salientar que cada técnica é capaz de quantificar produtos diferentes, sendo que um método isolado não deve ser usado como medida global de estresse oxidativo.

Além dos danos lipídicos, as EAO podem causar danos diretamente às proteínas, levando às diversas disfunções celulares. As enzimas, formadas a partir de aminoácidos essenciais, podem perder a atividade. Além disso, podem ocorrer danos aos receptores celulares, a interferência na sinalização intracelular mediada por proteínas e a alteração de proteínas de membrana com a função de transporte de íons.

Danos secundários podem ocorrer após o estresse oxidativo protéico: proteínas oxidadas podem ser reconhecidas por células do sistema imune, alterando a formação de anticorpos e gerando doenças auto-imunes. Enzimas responsáveis por reparações ao DNA (endonucleases, ligases, etc) também podem sofrer oxidação e aumentar a incidência de mutações (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A oxidação de DNA pode gerar mutações, carcinogênese, envelhecimento celular ou induzir apoptose. O mecanismo para este fenômeno é a oxidação de adenina, guanina e pirimidinas (citosina e timina). Estas reagem, respectivamente, com o peróxido de hidrogênio, oxigênio *singlet* e radicais hidroxil. As diferentes EAO têm locais específicos de interação com DNA e diferentes mecanismos de ação, de modo que podem interferir na sua replicação e alterar os pares de bases de aminoácidos transcritos. As alterações mais comuns são as transcrições trocadas de citosina para timina e de guanina para citosina. A transcrição de aminoácidos errôneos pode gerar super ou subexpressão de proteínas ou, ainda, expressando-as de maneira defeituosa, interferindo no bom funcionamento celular.

As bases de DNA e os nucleotídeos oxidados têm sido usados como biomarcadores de estresse oxidativo em cultura de células e tecidos. Pode-se, também, avaliar fluidos biológicos, como, por exemplo, a urina (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; CADET *et al.*, 1995).

#### 1.2.4 DOENÇAS RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO

O envolvimento das EAO na patogenia de um grande número de moléstias é, hoje, fato irrefutável. Existem evidências de que mais de 50 doenças podem estar relacionadas com o metabolismo oxidativo. Da mesma forma, o envelhecimento do organismo, ou seja, a perda da vitalidade celular com o avançar da idade é resultado dos danos acumulados pela ação das EAO na intimidade dos tecidos. (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

O cotidiano dos seres humanos está repleto de fatores que podem colaborar para a deterioração do organismo. Entre estes fatores podemos destacar o estresse psicológico, os maus hábitos alimentares, o consumo de álcool, o tabagismo, a exposição aos raios ultravioleta, a poluição do ar e o sedentarismo (MOLLER *et al.*, 1996).

Quanto ao estresse psicológico, tem sido relacionado por Moller *et al.*, (1996) que indivíduos com personalidades hostis são mais propensos à aterosclerose. Como a formação da aterosclerose está relacionada com os eventos de oxidação de lipoproteínas no endotélio, considera-se o estresse psicológico um fator importante para a formação de EAO e a conseqüente desordem vascular.

No que diz respeito aos hábitos alimentares, há, na literatura, um vasto índice de trabalhos que demonstraram, em combate ao câncer e às doenças cardiovasculares, os benefícios de uma dieta rica em antioxidantes e vitaminas (PAPAS, 1999). A restrição

calórica pode melhorar a habilidade do organismo de remover substâncias reativas, moléculas danificadas e reparar os danos causados ao DNA.

Existe uma grande correlação entre o consumo de álcool, as EAO e as desordens hepáticas. O alcoolismo eleva a LPO hepática promovendo severas doenças hepáticas como a cirrose. O consumo de bebidas alcólicas causa o aumento na concentração de HDL e diminui a habilidade de agregação plaquetária. As EAO são mediadoras de agregação plaquetária no endotélio lesionado, sendo fatores determinantes para o surgimento das doenças vasculares. Os radicais livres estão diretamente relacionados com estresse oxidativo em eventos de isquemia e reperfusão tecidual (HAMILTON *et al.*, 2003).

A condição de sedentarismo favorece distúrbios metabólicos podendo gerar obesidade. Fenster *et al.* (2002) descreveram a participação de adipócitos na formação das EAO, induzindo disfunções vasculares. Nesse sentido, Vincent *et al.* (2004) demonstraram aumento no dano oxidativo lipídico após o exercício físico acentuado em indivíduos obesos.

As EAO podem desencadear processos degenerativos, tais como a oclusão vascular por aterosclerose, a osteoartrite, o câncer brônquico, o pulmonar e o cutâneo, alterações no sistema digestivo e sistema nervoso central, o embranquecimento do cabelo, o aparecimento de rugas e de manchas cutâneas, entre outros. Numa falha genética que gera uma menor produção de enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPX), ocorrem extensas implicações metabólicas.

Muitas doenças respiratórias têm sido associadas ao aumento de produção de EAO, dentre estas a asma, a doença pulmonar obstrutiva crônica, a apnéia obstrutiva do sono, a síndrome do desconforto respiratório agudo, a fibrose idiopática, a pneumoconiose (RAHMAN, 2005; ANDRADE JUNIOR *et al.*, 2005). Enfim, muitas células do parênquima pulmonar são capazes de gerar EAO como as células endoteliais, as células alveolares tipo II, as células Clara, as células ciliadas da via aérea e os macrófagos pulmonares.

O sistema antioxidante pulmonar dispõe de diversos mecanismos protetores contra a oxidação. Dentre estes se destaca em nível alveolar a enzima catalase, uma proteína homotetramérica de 240kDa, responsável pela decomposição de peróxido de hidrogênio. Considerada a enzima mais importante no consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de origem exógena, esta enzima está localizada, fundamentalmente, em pneumócitos alveolares tipo II, que são as células pulmonares mais resistentes, mas, também, expressas em macrófagos (RAHMAN, 2005).



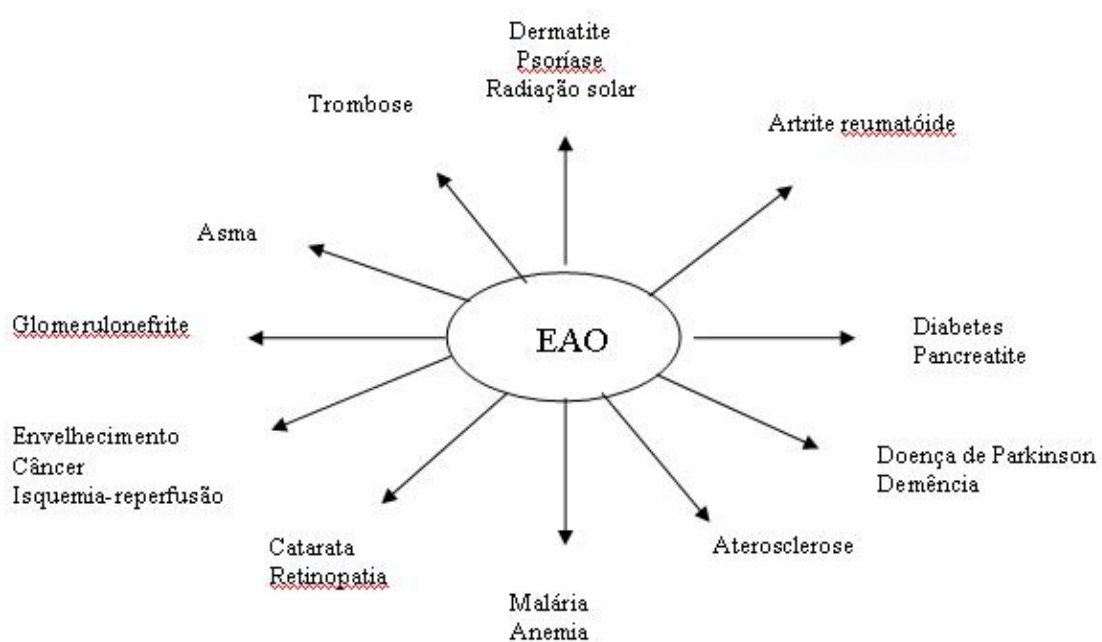


Figura 6. Algumas doenças humanas relacionadas com excessiva produção de espécies ativas de oxigênio (Adaptado de PINCEMAIL, 1995).

### 1.3 EXERCÍCIO

Atualmente é amplamente divulgado na literatura científica e, conseqüentemente, nos meios de comunicação em geral, os benefícios gerados por um estilo de vida saudável, tendo como fator de destaque para sua obtenção a prática de exercícios físicos regularmente.

Atividade física é considerada qualquer forma de atividade muscular e resulta no gasto energético proporcional ao trabalho muscular realizado. O exercício físico representa um subgrupo da atividade física planejado com o objetivo de melhorar ou manter o condicionamento (POWERS & HOWLEY, 2000).

Para uma análise de respostas metabólicas do exercício, devem ser levados em consideração alguns pontos fundamentais: primeiramente, deve estar claro se o fenômeno metabólico analisado é a resposta para aquela sessão de exercício (resposta aguda), ou se é uma resposta em uma sessão após um período de treinamento (resposta crônica); secundariamente, deve-se analisar a intensidade e a duração do exercício.

Uma sessão de exercício resulta em adaptações metabólicas tanto durante como depois do esforço. Durante a atividade muscular, a demanda energética pode superar a de repouso em até 35 vezes (ASTRAND *et al.*, 2003), enquanto o consumo de oxigênio pode aumentar de dez a quinze vezes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Portanto, a quantidade de sangue bombeada pelo coração deve ser alterada de acordo com a demanda elevada de oxigênio consumido na musculatura esquelética. Deste modo, os

fatores mais proeminentes no controle da frequência cardíaca durante o exercício são o sistema nervoso simpático e parassimpático. O aumento inicial da frequência cardíaca deve-se a remoção do tônus parassimpático e, posteriormente, de acordo com a intensidade, aumento na estimulação nervosa simpática sobre o nodo sinoatrial. Se a taxa de trabalho for constante e abaixo do limiar de lactato, um platô de estabilidade da FC, do volume sistólico e do débito cardíaco é atingido em dois ou três minutos. Além disso, os estímulos gerados pelo exercício em mecanorreceptores cardíacos e musculares, quimiorreceptores e barorreceptores auxiliam no controle cardiovascular através de um sistema de retroalimentação para o comando central localizado no cérebro.

Assim como o sistema cardiovascular, o sistema respiratório sofre adaptações rápidas ao iniciar uma sessão de exercício. Rapidamente ocorre um aumento na ventilação até encontrar um nível de estabilidade em cargas de trabalho constante. Alterações no pH sanguíneo estimulam receptores carotídeos com íons  $H^+$  aumentando a ventilação. Esta relação entre o pH e a ventilação resulta na mensuração do lactato sanguíneo como forma não invasiva para a verificação do limiar ventilatório. Catecolaminas circulantes e o aumento da temperatura corporal durante o exercício também contribuem para o aumento da ventilação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

### 1.3.1 EXERCÍCIO FÍSICO E ESTRESSE OXIDATIVO

As adaptações cardiopulmonares dependentes da intensidade e duração do exercício podem modular a resposta oxidante e antioxidante do organismo (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004). Segundo Moller *et al.* (1996), o exercício físico está relacionado ao estresse oxidativo de duas maneiras: por um lado o exercício acelera o metabolismo oxidativo gerando uma maior formação de radicais livres e, por outro, um efeito protetor antioxidante que pode ser gerado através de sessões regulares. A redução completa do O<sub>2</sub> no sistema de transporte de elétrons mitocondrial ocorre com aproximadamente 95% do O<sub>2</sub>, enquanto que o restante é reduzido pelo metabolismo celular formando EAO tanto em repouso como durante o exercício. Portanto, o que se altera durante o exercício é o consumo de O<sub>2</sub> por minuto e não a taxa de formação de EAO (SIGNORINI & SIGNORINI, 1993).

Desta forma, é possível relacionar o estresse oxidativo 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 (SOUZA *et al.*, 2005; ALESSIO, 1993). O dano oxidativo lipídico que ocorre na resposta aguda é proporcional à intensidade do exercício (ALESSIO, 1993; ALESSIO *et al.*, 1988), enquanto que os danos ao DNA, um indicativo de que mutações genéticas podem ser causadas por estresse oxidativo, não estão relacionados com a mesma (SEN, 1994). A correlação existente entre a concentração de lactato [LA], um marcador de intensidade, e

LPO, ambas diminuídas em exercício de baixa intensidade, sugere menor dano oxidativo gerado em exercícios submáximos.

Em intensidades baixas ou moderadas, pequenos incrementos na intensidade resultam em um significativo aumento no consumo de oxigênio ( $VO_2$ ) até que o estado de equilíbrio seja alcançado, fenômeno que leva aproximadamente 3 minutos, dependendo da magnitude do incremento e do estado de condicionamento do indivíduo. Em um exercício prolongado no estado de equilíbrio, com intensidade submáxima, há um leve aumento do consumo de oxigênio. O nível de catecolaminas circulantes contribui para este (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Já em um exercício intenso, quando o organismo não é capaz de manter a condição de equilíbrio, há a instalação de acidose metabólica e um rápido aumento na respiração mitocondrial. Quanto maior for a intensidade, mais rápido o aumento no consumo de oxigênio. Além disso, ocorre a degradação de ATP, indicada pela liberação de xantina e hipoxantina do músculo esquelético. A enzima xantina oxidase presente no músculo esquelético pode gerar radicais de hipoxantina e oxigênio. Então, quando os produtos da degradação do ATP se acumulam, a xantina oxidase pode gerar os radicais livres. Ao inibir esta enzima com alopurinol, há redução do estresse oxidativo e do dano muscular associado ao exercício exaustivo em humanos (VIÑA *et al.*, 2000).

O dano oxidativo pode depender, ainda, do grau de exaustão e não diretamente da intensidade (VIÑA *et al.*, 2000). Em 1982, Davies *et al.*, já haviam demonstrado o aumento de radicais livres no músculo e no fígado de ratos exercitados até a exaustão.

Diversas lesões musculares subcelulares, devido ao estresse oxidativo, têm sido relatadas diante de uma única carga de trabalho exaustivo demonstrando a correlação entre a LPO e os marcadores de lesões musculares (CHILD *et al.*, 1998) e entre as concentrações de lactato e LPO no plasma (LOVLIN *et al.*, 1987).

O redirecionamento do fluxo sanguíneo para os músculos em atividade também pode formar EAO. Ao encerrar a atividade física, órgãos como o fígado e o rim, ou mesmo os músculos não exercitados sofrem um efeito semelhante ao já conhecido isquemia-reperusão, sabidamente responsável pelo aumento de produção de EAO em vários tecidos (DI MEO & VENDITTI, 2001). Deste modo, as mitocôndrias do tecido reperfundido seriam o primeiro alvo do estresse oxidativo após o exercício.

O sistema enzimático antioxidante também sofre adaptações resultantes do exercício físico. Enzimas antioxidantes podem ser ativadas seletivamente durante uma sessão de exercício, dependendo da intensidade e do tecido. O músculo esquelético e o cardíaco estão diretamente envolvidos na produção das EAO necessitando de imediata proteção contra as mesmas. As enzimas SOD, CAT e GPx são as defesas primárias contra o dano oxidativo, tanto em animais quanto em humanos (DEL MAESTRO, 1980; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). No entanto, as informações encontradas na literatura relacionadas às adaptações dessas enzimas não são conclusivas, provavelmente por uma grande diversificação de protocolos de treinamento em modelos experimentais diferentes (natação ou esteira), variando em intensidade e duração (SCHENEIDER & OLIVEIRA, 2004; JI, 1993). De uma maneira geral, após uma sessão de exercício, ocorre o aumento na atividade das enzimas antioxidantes em diversos órgãos.

Especificamente no coração, a demanda metabólica resultante do exercício físico causa um aumento na produção de EAO (BEJMA *et al.*, 2000) a partir do aumento nos níveis de LPO e de atividade das enzimas antioxidantes como SOD (NAVARRO-AREVALO *et al.*, 1999), CAT e GPX (BEJMA *et al.*, 2000). Embora o pulmão apresente resposta semelhante ao exercício quanto à resposta oxidativa (HATAO *et al.*, 2006; CAILLAUD *et al.*, 1999), Giannerini *et al.* (2001) demonstram que cada tecido responde de forma diferente a um evento oxidativo, com respostas enzimáticas independentes de outros tecidos.

### 1.3.2 TREINAMENTO FÍSICO E ESTRESSE OXIDATIVO

Em organismos treinados ou não treinados, a percentagem representativa da quantidade de oxigênio que não é reduzido pela citocromo-oxidase aumenta na mesma proporção do aumento do volume global de O<sub>2</sub> que é admitido por uma demanda maior da célula. Neste aspecto se poderia até esperar um estresse oxidativo maior no organismo treinado. No entanto, o que se vê é que a demanda de antioxidantes no organismo treinado também é maior, evitando, assim, as conseqüências de um estresse oxidativo patológico (KIRAN *et al.*, 2004).

Pela compreensão destes eventos, pode-se deduzir que o fator chave do condicionamento ideal num organismo está centrado na adequação bioquímica deste ao estado metabólico imposto pelas condições de esforço. Neste aspecto, foi encontrada uma maior atividade eritrocitária da enzima GPx em triatletas comparados aos indivíduos não treinados e uma capacidade antioxidante total (TRAP) aumentada após o exercício em esteira rolante a ambos os grupos (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004). Além disso, o treinamento parece modular a expressão de proteínas de choque térmico e de membrana tendo, desta forma, uma participação direta no sistema de defesa antioxidante e sendo responsáveis pelo reparo aos danos oxidativos (KRAUSE *et al.*, 2007).

Atletas de resistência aeróbia possuem predominância de fibras lentas, nas quais se encontra um grande número de mitocôndrias, sendo a maior parte delas localizadas próximas à periferia da fibra e aos capilares sanguíneos, os quais fornecem um amplo



suprimento de oxigênio. Estas fibras possuem uma alta capacidade para o metabolismo oxidativo, resistem a fadiga e são especializadas no desempenho de ações intensas e repetidas por períodos prolongados. Sobre estas fibras estão relacionados os efeitos do treinamento no que diz respeito a liberação, a captação e a utilização do oxigênio. Estas adaptações metabólicas periféricas resultam em maior produção de energia e mais eficiente remoção de “lixo” metabólico, desta forma reduzindo fatores considerados responsáveis pela fadiga.

Sabe-se, também, que um maior condicionamento aeróbio gera níveis menores de liberação de cortisol e de catecolaminas (POWERS & HOWLEY, 2000), implicando em menor estresse global e menor frequência cardíaca. Assim, como uma terapia cardiovascular, o exercício combate através de adaptações do sistema antioxidante doenças como as dislipidemias, a hipertensão, o *diabetes mellitus*, a obesidade, a trombose e a disfunção endotelial (SHEPHARD & BALADY, 1999), todas relacionadas ao estresse oxidativo (PINCEMAIL, 1995).

O organismo treinado, de acordo com Nies *et al.* (1996), pode obter a redução dos efeitos das EAO quanto aos danos no DNA de leucócitos circulantes, após exercício exaustivo em esteira comparado aos indivíduos não treinados. Em animais, a adaptação resultante do treinamento também diminui estes efeitos (HUSAIN, 2003; HUSAIN & HAZELRIG, 2002; RADAK *et al.*, 2000).

Jl (1993) demonstrou que em músculo esquelético uma carga isolada de trabalho exaustivo produzia um aumento de LPO e que a atividade das enzimas GPx, GR, SOD e

CAT estavam significativamente aumentadas. Alessio (1993) cita um aumento de LPO em fibras musculares lentas e rápidas de ratos submetidos a cargas de exercício, indicando um aumento do estresse oxidativo induzido pela atividade. Este estresse era mais bem tolerado por ratos treinados, sugerindo uma adaptação dos sistemas oxidantes. No entanto, as adaptações ao treinamento parecem ser dependentes da intensidade, do volume do treinamento e tecido específico (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

## 1.4 EXERCÍCIO FÍSICO E POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA.

Sabendo-se que tanto a inalação de poluentes quanto o exercício físico tem como resposta aguda a produção de EAO, torna-se pertinente a seguinte questão: Como responde o organismo ao realizar uma sessão de exercício físico em um ambiente com níveis indesejáveis de poluição?

Poucas referências foram encontradas na literatura relacionando a prática de exercícios físicos, a inalação de poluentes e ao estresse oxidativo.

As respostas fisiológicas do organismo frente aos poluentes estão relacionadas à quantidade ou à “dose” recebida. Os principais fatores que determinam a dose são a concentração de poluente, a duração da exposição e o volume de ar inalado. Este último fator aumenta a deposição de partículas ultrafinas ( $<10\mu\text{m}$ ) nas vias aéreas em até 4,5 vezes durante o exercício físico comparado ao repouso. O aumento da ventilação e o uso da respiração bucal e não a nasal durante o exercício (DAIGLE *et al.*, 2003) são fatores responsáveis pela maior deposição de partículas, além de ser uma razão pela qual a atividade física é abreviada durante os momentos de níveis de pico de poluição (FOLINSBEE, 1990). Nesse sentido, Turnovska *et al.* (2007) demonstraram aumento da ventilação durante o exercício em crianças residentes em uma região intensamente poluída, quando comparadas às crianças de uma região com menores concentrações de MP. A emissão de gases como o monóxido de carbono reduz a capacidade de transporte de hemoglobina para conversão em carboxi-hemoglobina gerando um efeito compensatório do aumento da frequência ventilatória. (WHIPP & WASSERMAN, 1991).

Alguns estudos utilizaram o exercício físico como modo de exacerbar as respostas mecânicas ventilatórias após a exposição aos poluentes, encontrando como resposta a diminuição da Capacidade Vital Forçada (CVF) e, no Volume Expiratório Forçado em 1 segundo ( $VEF_1$ ) e três segundos ( $VEF_3$ ) (TURNOVSKA *et al.*, 2007; VOLPINO *et al.*, 2004; TIMONEN *et al.*, 2002; SALVI *et al.*, 1999; DRECHSLER-PARKS *et al.*, 1987).

Um estudo realizado na cidade do México (VILLAREAL-CALDERON *et al.*, 2002) questiona o horário da educação física escolar, justamente por ser praticada em horários e locais de grandes concentrações de poluentes, correlacionado com o aumento da incidência de admissões hospitalares por doenças respiratórias. A preocupação com os locais para prática de exercícios durante o horário escolar também foi relatada em outros estudos (GILLILAND *et al.*, 1999; TURNOVSKA *et al.*, 2007).

Indivíduos com doenças coronarianas apresentam maiores riscos de sofrer arritmias cardíacas quando praticam exercícios expostos aos poluentes, devido às alterações no sistema nervoso simpático e parassimpático, diagnosticadas através das alterações no segmento S-T do eletrocardiograma (ECG) (PEKKANEN *et al.*, 2002). Zareba *et al.* (2001) também analisando o segmento S-T identificaram mudanças súbitas no funcionamento do miocárdio.

A redução da variabilidade da frequência cardíaca é um indicador de alterações no controle simpático e parassimpático cardíaco, além de ser um sintoma associado ao aumento da morbidade e da mortalidade (TSUJI *et al.*, 1996). O estudo de Gold *et al.* (2000) sugeriu que houve um decréscimo na função parassimpática após inalação de MP



Além dos estudos epidemiológicos que correlacionam altas concentrações com as doenças respiratórias, estudos recentes têm procurado detalhar o nível de exposição individual ao MP de acordo com os fatores sócio-demográficos e com as atividades diárias. Os riscos associados à poluição passam a depender não somente da cidade em que a pessoa vive, mas onde especificamente na cidade na qual o indivíduo desempenha as suas atividades diárias (DOCKERY & STONE, 2007). Deste modo, surge o dado de que os indivíduos que praticam exercício em rodovias e nos grandes centros urbanos são mais expostos à poluição por MP (SHARMAN *et al.*, 2004).

A prática de exercício físico regular é comum com o objetivo de melhorar o condicionamento físico do organismo tornando-o menos propenso a doenças cardiovasculares. Frequentemente, as pessoas realizam este tipo de atividade em locais (parques) próximos a autovias de fluxo intenso e nos horários dos picos de tráfego, conseqüentemente expostos a elevadas concentrações de MP. Assim, a questão é investigar se ao exercitar-se nestes locais o indivíduo não estará sujeito à condição adversa e, portanto, provocando malefícios à saúde. Até o momento, não existem dados na literatura respondendo a tais questões, o que justifica a realização deste estudo.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Estudar o estresse oxidativo pulmonar e cardíaco, bem como parâmetros hemodinâmicos de ratos expostos agudamente ao MP durante uma sessão de exercício físico.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1- Avaliar o estresse oxidativo pulmonar de ratos expostos ao MP de uma amostra do ar de Porto Alegre durante 20 ou 60 minutos de exercício físico, através da determinação do TBARS, QL e CAT.

2- Avaliar o estresse oxidativo pulmonar de ratos tratados com instilação intra-traqueal de ROFA e submetidos a 20 minutos de exercício, através da determinação do TBARS, QL e CAT.

3- Avaliar o estresse oxidativo cardíaco de ratos tratados com instilação intra-traqueal de ROFA e submetidos a 20 minutos de exercício, através da determinação do TBARS, QL e CAT.

4- Avaliar a função hemodinâmica de ratos tratados com instilação intra-traqueal de ROFA durante 20 minutos de exercício físico, através da análise da FC, PAS, PAD e PAM.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSIO, H.M.; GOLDFARB, A.H.; CUTLER, R.G. –MDA content increases in fast and slow twitch intensity of exercise in rat. – *American Journal of Physiology*, 255(6 Pt 1): C874-7, 1988.

ALESSIO, H.M. – Exercise-induced oxidative stress.- *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 25(2): 218-224, 1993.

AMM, B.B., FONNUM, F. –ROS scavenging effects of organic extract of diesel exhaust particles on human neutrophil granulocytes and rat alveolar macrophages. *Toxicology*, 230: 207-218, 2007.

ANDRADE JUNIOR, D.H., SOUZA, R.B., SANTOS, S.A., ANDRADE, D.R. – Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 31(1): 60-68, 2005.

ASTRAND, PO; RODHAL, K; DAHL, HÁ- SROMME, SB. - Textbook of work physiology. *Physiological Basis of Exercise*. 4<sup>th</sup>. Ed., Champaign, Human Kinetics, 2003.

AUGER, F., GENDRON, M., CHAMOT, C., MARANO, F., DAZY, A. –Responses of well-differentiated nasal epithelial cells exposed to particles: Role of epithelium in airway inflammation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 215: 285-294, 2006.

BEJMA, J., RAMIRES, P., JI, L.L. – Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver. *Acta Physiologica Scandinavica*, 169: 343-351, 2000.

BELL, M.L., DAVIS, D.L., GOUVEIA, N. BORJA-ABURTO, N.H, CIFUENTES, L.A.- The avoidable health effects of air pollution in three Latin American cities: Santiago, Sao Paulo, and Mexico City. *Environmental Research*, 100(3): 431-440, 2006.

BOVERIS, A., CADENAS, E., CHANCE, B. - Ultraweak chemiluminescence: a sensitive assay for oxidative radical reactions. *Federation Proceedings*, 40(2): 195-198, 1981.

BROOK, R.D., FRANKLIN, B., CASCIO, C.W., HONG, Y., HOWARD, G., LIPSETT, M., LUEPKER, R., MITTLEMAN, M., SAMET, J., SMITH, S., TAGER, I. – Air pollution and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from expert panel on population and prevention science of American heart association. *Circulation*, 109: 2655-2671, 2004.



CADET, J.; BERGER, M.; MORIN, B.; RAOUL, S.; WAGNER, J.R. – Oxidative damage to DNA. - In FAVIER *et al.* Analysis of Free Radicals in Biological Systems: Birkhauser, 1995

CAILLAUD, C., PY, G., EYDOUX, N., LEGROS, P., PREFAUT, C. MERCIER, J. Antioxidants and mitochondrial respiration in lung, diaphragm, and locomotor muscles: effects of exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9/10): 1292-1299, 1999.

CANÇADO, J.E.D., SALDIVA, P.H.N., PEREIRA, L.A.A., LARA, L.B.L.S., ARTAXO, P., MARTINELLI, L.A., ARBEX, M.A., ZANOBETTI, A., FRAGA, A.L.F. – The impact of sugar cane-burnibg emissions on the repiratory system of children and elderly. *Environmental Health Perspectives*, 114(5): 725-729, 2006.

CARLISLE, A.J., SHARP, N.C.C. Exercise and outdoor ambient air pollution. *British Journal of Sports Medicine*, 35: 214-222, 2001.

CHILD, R.B; WILKINSON, D.M.; FALLOWFIELD, J.L.; DONNELLY, A.E. - Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Medicine Science Sports and Exercise*, 30: 1603-1607, 1998.

CIFUENTES, L., KRUPNICK, A.J., O'RYAN, R. TOMAN, M.A.– Urban air quality and human health in Latin America and Caribbean. Working paper in Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. Washington D.C., 2005.

DAIGLE C.C.; CHALUPA, D.C.; GIBB, F.R.; MORROW, P.E.; OBERDOSTER, G.; UTELL, M.J.; FRAMPTOM, M.W. – Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. *Inhalation Toxicology*, 15(6): 539-552, 2003

DAVIES, K.J.A.; QUINTANILHA, A.T.; BROOKS, G,A.; PACKER, L. – Free radicals and tissue damage produced by exercise. – *Biochemichal Biophysical Research Communications*, 107(4): 1198-1205, 1982.

DEL MAESTRO, R.F. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiologica Scandinavica*, 492: 153-168, 1980.

DELFINO, R.J., QUINTANA, P.J.E., FLORO, J., GASTANAGA, V.M., SAMIMI, B.S., KLEINMAN, M.T., LIU, J.S., BUFALINO, C., WU, C., McLAREN, C.E. – Association of FEV<sub>1</sub> in asthmatic children with personal and mircroenvironmental exporure to airborne particulate matter. *Environmental Health Perspectives*, 112(8): 932-941, 2004.

DeMEO, D.L., ZANOBETTI, A., LITONJUA, A.A., COULL, B.A., SCHWARTZ, J., GOLD, D.R. – Ambient air pollution and oxygen saturation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170(4): 383-387, 2004.

DEVLIN, R.B., GHIO, A.J., KEHRL, H., SANDERS, G., CASCIO. – Elderly humans exposed to concentrated air pollution particles have decreases heart rate variability. *European Respiratory Journal*, 21(suppl. 40): 76s-80s, 2003.

Di MEO, S.; VENDITTI, P. – Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. - *Biological Signal and Receptors*, 10: 125-140, 2001.

DYE, J., ADLER, K.B., RICHARDS, J.H., DREHER, K. Role of soluble metal in oil fly ash-induced airway epithelium injury and cytokine gene expression. *Lung Cellular and Molecular Physiology*, 21: 1498-1510, 1999.

DRECHSLER-PARKS, D.M.; BEDI, J.F.; HORVATH, S.M. - Pulmonary function responses of older men and women to ozone exposure. *Experimental Gerontology*. 22(2): 91-101, 1987.

DOCKERY, D.W., STONE, P.H. – Cardiovascular risks from fine particulate air pollution. *New England Journal of Medicine*, 356: 511-513, 2007.

ESCOBEDO, F.J., WAGNER, J.E., NOWAK, D.J., MAZA, C.L., RODRIGUEZ, M., CRANE, D.E. Analyzing the cost effectiveness of Santiago, Chile's policy of using urban forests to improve air quality. *Journal of Environmental Management, On line*, 2007

EPA. Air Quality Criteria for Particulate Matter. United States Environmental Protection Agency, Research Triangle Park NC 27711, April 1996, EPA: 600:P-95:001cF.

FARHAT, S.C., PAULO, R.L., SHIMODA, T.M., CONCEICAO, G.M., LIN, C.A., BRAGA, A.L., WARTH, M.P., SALDIVA, P.H. Effect of air pollution on pediatric respiratory emergency room visits and hospital admissions. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, 38(2):227-235, 2005.

FENSTER, C.P., WEINSIER, R., L, DARLEY-USMAR, V.M., PATEL, R.P. – Obesity, aerobic exercise and vascular disease: the role of oxidant stress. *Obesity Research*, 10(9): 964-968, 2002.

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. – Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43(1): 61-68, 1997.

FOLINSBEE, L.J.- Discussion: exercise and the environment. *Exercise, Fitness and Health*, 179-183, 1990.

FREITAS, C., BREMMER, S.A., GOUVEIA, N., PEREIRA, L.A.A., SALDIVA, P.H.N. Hospital admissions and mortality: association with air pollution in São Paulo, Brazil, 1993-1997. *Revista de Saúde Pública*, 38(6): 751-757, 2004.

GERDE, P. – Animal models and their limitation: On the problem of high-to-low dose extrapolation following inhalation exposures. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57: 143-146, 2005.

GHIO, J.A., GILBEY, J.G., ROGGL, V.L., RICHARDS, J.H., McGEE, J.K., CARSON, J.L., DEVLIN, R.B., CASCIO, W.E. – Diffuse alveolar damage after exposure to an oil fly ash. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164: 1514-18, 2001.

GHIO, J.A., SILBAJORIS, R., CARSON, J.L., SAMET, J.M. – Biologic effects of oil fly ash. *Environmental Health Perspectives*, 110 (suppl.1): 89-94, 2002.

GIANNERINI, f., GIUSTARINI, D., LUSINI, L., ROSSI, R., SIMPLICIO, P. – Responses of thiols to an oxidant challenge: differences between blood and tissues in the rat. *Chemico-Biochemical Interactions*, 134: 73-85, 2001.

GILLILAND, F.D., MCCONNELL, R., PETERS, J., GONG, H. J.R. - A theoretical basis for investigating ambient air pollution and children's respiratory health. *Environmental Health Perspectives*, 107 (Suppl 3): 403-7, 1999.

GODLESKI, J.J; CLARKE, R.W. - Pathophysiological Mechanisms of Cardiopulmonary Effects. In: Gehr, P. Heyder, J. Particle-Lung Interactions. 1.Ed. Nova Iorque, Marcel Dekker:, cap.15, pp. 577-601, 1998.

GOLD, D.R.; LITONJUA, A.; SCHWARTZ,J.; LOVETT,E.; LARSON, A.; NEARING, B.; ALLEN,G.; VERRIER, M.; CHERRY, R.; VERRIER, R. –Ambient air pollution and heart rate variability. – *Circulation*, 101: 1267-73, 2000.

GOUVEIA, N., BREMMER, S.A., DOVAES, H.M.D. - Association between ambient air pollution and bith weight in São Paulo. *Journal of Epidemiology Community Health*, 58: 11-17, 2004.

GOMES, M.J.M. Ambiente e Pulmão. *Journal of Pneumology*, 28(5): 261-269, 2002.

GONZALEZ-FLECHA, B. – Oxidant mechanisms in response to ambient air particles. – *Molecular Aspects of Medicine*, 25:169-182, 2004.

GRIEVINK, L., JANSEN, S.M., VEER, P.V., BRUNEKREF, B. Acute effects of ozone on pulmonary function of cyclists receiving antioxidant supplements. *Occupational Environmental Medicine*, 55: 13-17, 1998.

GURGUEIRA, S.A.; LAWRENCE, J.; COULL, B.; MURTHY, G.G. K.; GONZÁLES-FLECHA, B. – Rapid increase in steady-state concentration of reactive oxygen species in lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environmental Health Perspectives*, 110: 749-755, 2002.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free radicals in biology and medicine. 3. Ed. New York: Oxford, 1999.

HAMILTON, K.L; STAIB, J.L; PHILLIPS, T.; HESS, A.; LENNON, S.L.; POWERS, S. – Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. – *Free Radical Biology & Medicine*, 34(7): 800-809, 2003

HATAO, H., OH-ISHI, S., ITOH, M., LEEUWENBURGH, C., OHNO, H., OOKAWARA, T., KISHI, K., YAGYU, H., NAKAMURA, H., MATSUOAKA. Effects of acute exercise on lung antioxidants enzymes in young and old rats. *Mechanisms of Aging and Development*, 127: 384-390, 2006.

HAUCK, H. Revision of ambient air quality standards for PM. *Toxicology Letters*, 96-97: 269–276, 1998.

HUSAIN, K. – Interaction of regular exercise and chronic treatment on blood pressure and rat aortic antioxidants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1688: 18-25, 2003.

HUSAIN, K.; HAZELRIGG, S.R.- Oxidative injury due to chronic oxide synthase inhibition in rat: effect of regular exercise on the heart. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1587: 75-82, 2002.

IBALDI-MULLI, A., TIMONEM, K.L., PETERS, A., HEINRICH, J., WOLKE, G., LANKI, T., BUZORIUS, G., KREYLING, W.G., HARTOG, J., HOEK, G., BRINK, H.M., PEKKANEN, J. – Effects of particulate air pollution on blood pressure and heart rate in subjects with cardiovascular disease: a multicenter approach. *Environmental Health Perspectives*, 112(3): 369-377, 2004.

IMRICH, A., NING, Y.Y., LAWRENCE, J. COULL, B., GITIN, E., KNUTSON, M. KOBZIK, L. – Alveolar macrophage cytokine response to air pollution particles: oxidant mechanisms. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 218: 256-264, 2007.

IWAOKA, T., TABATA, F., TAKAHASHI, T. Lipid peroxidation and lipid peroxide detected by chemiluminescence. *Free Radical Biology and Medicine*, 3(5): 329-33, 1987.

Jl, L.L. – Antioxidants and Oxidative stress in exercise. *Proceedings of Society for experimental Biology and Medicine*, 222: 283-292, 1999.

Jl, L.L. – Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 25(2): 225-231, 1993.

KELLY, F.J.; SANDSTROM, T. – Air pollution, oxidative stress, and allergic response. – *The Lancet*, 363: 95-96, 2004.

KIRAN, T.R., SUBRAMANYAM, DEVI, S.A. – Swim exercise training and adaptations in antioxidant defense system of myocardium of old rats: relationship to swim intensity and duration. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 137: 187-196, 2004.

KLOT, S.V., PETERS, A., AALTO, P., BELLANDER, T., BERGLIND, N., D'IPPOLITI, D., ELOSUA, R., HORMANN, A., KULMALA, M., LANKI, T., LOWEL, H., PEKKANEN, J., PICCIOTTO, S., SUNYER, J., FORASTIERE, F.; HEALTH EFFECTS OF PARTICLES ON SUSCEPTIBLE SUBPOPULATIONS (HEAPSS) STUDY GROUP. Ambient air pollution is associated with increased risk of hospital cardiac readmissions of myocardial infarction survivors in five European cities. *Circulation*, 112(20): 3073-3079, 2005.

KRAUSE, M.S., OLIVEIRA, L.P. JR, SILVEIRA, E.M., VIANNA, D.R., ROSSATO, J.S., ALMEIDA, B.S., RODRIGUES, M.F., FERNANDES, A.J., COSTA, J.A., CURI, R., DE BITTENCOURT, P.I. JR. MRP1/GS-X pump ATPase expression: is this the explanation for the cytoprotection of the heart against oxidative stress-induced redox imbalance in comparison to skeletal muscle cells? *Cell Biochemistry and Function*, 25(1): 23-32, 2007.

LAGORIO, S., FORASTIERI, PISTELLI, R., IAVARONE, I., MICHELOZZI, P., FANO, V., MARCONI, A., ZIEMACKI, G., OSTRO, B.D. – Air pollution and lung function among susceptible adult subjects: a panel study. *Environmental Health; A Global Access Science Source*, 5(11): 1-12, 2006.

LAGORIO, S., FORASTIERE, F., PISTELLI, R., IAVARONI, I., FANO, V., DELA CORTE, A.M., FUSO, L., MAIOLO, C., SAMMARRO, S., SERRA, M., SPDARO, S., TRAMAGLINO, L.M., CATTANI, G., STACHCHINI, G., MARCONI, A., ZIEMACK, G., OSTRO, B. – Inquinamento atmosferico e funzionalità cardiaca e respiratoria in ter gruppi di pazienti. *Annali Dell'Istituto Superiore di Sanita*, 39(3): 395-404, 2003.

LOVLIM, R.; COTTLE. W.; PYKE, I.; KAVANAGH, M.; BELCASTRO, A.N.; - Are indices of free radical damage related to exercise intensity? *European Journal of Applied Physiology*, 56: 312-6, 1987.

MARCONI, A. Materiale particellare aerodisperso: definizioni, effete, sanitari, misura e sintesi delle ingagini ambientali effettuate a Roma. *Annali Dell'stituto Superiori di Sanita*, 39(3): 329-42, 2003.

MAZZARELA, G., FERRARACCIO, F., PRATI, M.V., ANNUNZIATA, S., BIANCO, A., MEZZOGIORNO, A., LIGUORI, G., ANGELILLO, I.F., CAZZOLA, M. – Effects of diesel exhaust particles on human lung epithelial cells: an in vitro study. *Respiratory Medicine*, On line, 2007.

MOLLER, P.; WALLIN, H.; KNUDSEN, L.E. – Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemical-Biological Interactions*, 102: 17-36, 1996.

MUDWAY, I.S.; STENFORS, N.; DUGGAN, S.T.; ROXBOROUGH, H.; ZIELINSKI, H.; MARKLUND S.L.; BLOMBERG, A.; FREW, A.J.; SANDSTROM, T.; KELLY, F.J. - An *in vitro* and *in vivo* investigation of the effects of diesel exhaust on human airway lining fluid antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 423(1): 200-12, 2004.

NASCIMENTO, L.F.C., PEREIRA, L.A.A., BRAGA, A.L.F., MODOLO, M.C.C., CARVALHO JR, J.A. – Efeitos da poluição atmosférica na saúde infantil em São José dos Campos, SP. *Revista de Saúde Pública*, 40(1): 77-82, 2006.

NAVARRO-AREVALO, A., CANAVATE, C., SANCHEZ-DEL-PINO, M.J. – Myocardial and skeletal muscle aging and changes in oxidative stress in relationship to rigorous exercise training. – *Mechanisms of Aging and Development*, 108: 207-217, 1999.

NIES, A.M.; HARTMANN, A.; GRUNERT-FUCHS, M.; POCH, B.; SPEIT, G. - DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. - *International Journal of Sports Medicine*, 17: 397-403, 1996.

OGA, S – Fundamentos de Toxicologia – São Paulo: Editora Atheneu, 1996

O'RYAN, R., LARRAGUIBEL, L. – Contaminacion del aire en Santiago: estado actual y soluciones. Documento de Trabajo CEA No. 75. Universidad de Chile. *Appud* BELL, M.L., DAVIS, D.L., GOUVEIA, N. BORJA-ABURTO, N.H, CIFUENTES, L.A.- The avoidable health effects of air pollution in three Latin American cities: Santiago, Sao Paulo, and Mexico City. *Environmental Research*, 100(3): 431-40, 2006.

PAPAS, A.M., Diet and antioxidant status. *Food and chemical Toxicology*, 37(9-10): 999-1007, 1999.

PEKKANEN, J.; PETERS, A.; HOEK, G.; HEINRICH, J.; IBALD-MULLI, A.; KREYLING, W.G.; LANKI, T.; TIMONEN, K.L.; VANNINEN, E. – Particulate airpollution and risk of ST-segment depression during repeated submaximal exercise tests among subjects with coronary heart disease – the exposure and risk assesment for fine and ultrafine particles in ambient air study. *Circulation*, 106: 933-38, 2002.

PEREIRA, C.E.L. Estudo do estresse oxidativo e da resposta inflamatória pulmonar por exposição aguda ao material particulado e o papel da via do óxido nítrico. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em ciências médicas. Porto Alegre: Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, 2006.

PETTINEN, P.; TIMONEN, K.L.; TITTANEN, P.; MIRME, A.; RUUSKANEN, J.; PEKKANEN, J. – Number of concentration and size of particles in urban air: effects on spirometric function in adults subjects. *Environmental Health Perspectives*, 109(4): 319-323, 2001.

PINCEMAIL, J. – Free radicals and antioxidants in human diseases. In FAVIER *et al.* Analysis of Free Radicals in Biological Systems: Birkhauser, 1995

PINHO, R.A.; BONATTO, F.; ANDRADES, M.; FROTA, M.L.C.; RITTER, C.; KLMT, F.; DAL-PIZZOL, F.; KULCZYNSKI, U.; MOREIRA, J.C.F. – Lung oxidative response after acute coal dust exposure. *Environmental Research*, 96; 290-7, 2004.

PINHO, R.A.; SILVEIRA, P.C.L.; SILVA, L.A.; STRECK, E.L.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C.F. – N-acetylcysteine and deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. *Environmental Research*, 99: 355-60, 2005.

POWERS, S.K.; HOWLEY, E.T. – Fisiologia do Exercício: Teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho. 3. Ed. São Paulo: Manole, 2000.

RADAK, Z.; SASVÁRI, M.; NYASKAS, C.; PUCSOK, J.; NAKAMOTO, H.; GOTO, S.- Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 376(2): 248-251, 2000.

RAHMAN, I. – The role of oxidative stress in pathogenesis of COPD: implications for therapy. *Treatments in Respiratory Medicine*, 4(3): 175-200, 2005.

RHODEN, C.R.; LAWRENCE, J.; GODLESKI, J.J.; GONZÁLES-FLECHA, B.- N-acetylcysteine prevents lung inflammation after short-term inhalation exposure to concentrated ambient particles. *Toxicology Sciences*, 79(2): 296-303, 2004.

RHODEN, C.R.; WELLENIUS, G.A.; GHELFI, E.; LAWRENCE, J.; GONZALEZ-FLECHA, B. - PM-induced cardiac oxidative stress and dysfunction are mediated by autonomic stimulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1725(3): 305-313, 2005.

RICE, T.M.; CLARKE, R.W.; GODLESKI, J.J.; AL-MUTAIRI, E.; JIANG, N.-F.; HAUSER, R.; PAULAUSKIS, J.D. Different Ability of Transition Metals to Induce Pulmonary Inflammation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 177: 46-53, 2001.

SALDIVA, P.H.; LICHTENFELS, A.J.; PAIVA, P.S.; BARONE, I.A.; MARTINS, M.A.; MASSAD, E.; PEREIRA, J.C.; XAVIER, V.P.; SINGER, J.M.; BOHM, G.M. Association between air pollution due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brazil: a preliminary report. *Environmental Research*, 65: 218-225, 1994.

SALDIVA, P.H.; POPE, C.A; SCHWARZ, J.; DOCKERY, D.W.; LICHTENFELS, A.J; SALGE, J.M.; BARONE, I.; BOHM, G.M. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in São Paulo, Brazil. *Archives Environmental Health*, 50:159-163, 1995

SALVI, S., BLOMBERG, A., RUDELL, B., KELLY, F., SANDSTROM, T., HOLGATE, S.T., FREW, A. – Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust human volunteers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 159: 702-9, 1999.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, M.A., RETANA-UGALDE, R., RUÍZ-RAMOS, M., MUÑOZ-SÁNCHEZ, J.L., VARGAS-GUADARRAMA, L.A., MENDOZA-NÚÑEZ, V.M.. Efficient antioxidant capacity against lipid peroxide levels in healthy elderly of Mexico City. *Environmental Research*, 97(3): 322-9, 2005.

SANTOS, U.P., BRAGA, A.L.F., GIORGI, D.M.A.G., PEREIRA, L.A.A., GRUPI, C.J., LIN, C.A., BUSSACOS, M.A., ZANETTA, D.M.T., SALDIVA, P.H.N., TERRA FILHO, M., - Effects of air pollution on blood pressure and heart rate variability: a panel study of vehicular traffic controllers in the city of São Paulo. *European Heart Journal*, 26: 193-200, 2005.

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*, 10(4): 308-313, 2004.

SEAGRAVE, J., McDONALD, J.D., MAUDERLY, J.L. – In vitro versus in vivo exposure to combustion emissions. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57: 233-238, 2005.

SEAGRAVE, J., MCDONALD, J.D., BEDRICK, E., EDGERTON, E.S., GIGLIOTTI, A.P., JANSEN, J.J., KE, L., NAEHER, L.P., SEILKOP, S.K., ZHENG, M., MAUDERLY, J.L. - Lung toxicity of ambient particulate matter from southeastern U.S. sites with different contributing sources: relationships between composition and effects. *Environmental Health Perspects*, 114(9): 1387-1393, 2006.

SEN, C.K; MUSTAFA, A.; HANNINEN, O. – Exercise-induced oxidative stress: Glutathione supplementation and deficiency. – *Journal Applied Physiology*, 77(50): 2177-2187, 1994.

SEN, C.K., PACKER, L. – Thiols homeostasis and supplements in physical exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72(suppl): 653s-69s, 2000.

SHARMAN, J.E., COCKCROFT, J.R., COOMBES, J.S. - Cardiovascular implications of exposure to traffic air pollution during exercise. *Quarterly Journal of Medicine*, 97: 637-643, 2004.



SHEPHARD, R.J.; BALADY, G.J.- Exercise as cardiovascular therapy. *Circulation*, 99(7): 963-72, 1999.

SIES H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2): 291-295, 1997.

SIGNORINI, J.L.; SIGNORINI, S.S. – Atividade Física e Radicais Livres: aspectos biológicos, químicos, fisiopatológicos e preventivos. Universidade de São Paulo-Ícone: São Paulo, 1993.

SMITH, L.H., THEIR, S.O. Pathophysiology: The biological principles of disease. Vol I, Saunders Company, 1981.

SOUKUP, J.M., BECKER, S. Human alveolar macrophage responses to air particulates are associated with insoluble components of coarse material including particle endotoxin. – *Toxicology and Applied Pharmacology*, 171(1): 20-26, 2001.

SOUZA, T.P., OLIVEIRA, P.R., PEREIRA, B. – Exercício físico e estresse oxidativo. Efeitos do exercício intenso sobre a quimiluminescência urinária e malondialdeído plasmático. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 11(1): 91-96, 2005.

SULLIVAN, J., HUBBARD, R., LIU, S., SHEPHERD, K., TRENGA, C.A., KOENIG, J.Q., CHANDLER, W.L., KAUFMAN, J.D. – A community study of the effect of particulate matter on blood measures of inflammation and thrombosis in elderly population. *Environmental Health*, 6(3): On line, 2007.

TAO, F.; GONZALEZ-FLECHA, B.; KOBZIK, L. Reactive Oxygen Species in Pulmonary Inflammation by Ambient Particulates. *Free Radical Biology & Medicine*, 35(4): 327–340, 2003.

TIMONEN, K.L.; PEKKANEN, J.; TITTANEN, P.; SALONEN, R.O. – Effects of air pollution on changes in lung function induced by exercise in children with chronic respiratory symptoms. *Occupational Environmental Medicine*, 59(2): 129-34, 2002.

TSUJI, H.; LARSON, M.G; VENDITTI, F.J.; MANDERS, E.; EVANS, J.C.; FELDMAN, C.L.; LEVY, D. – Impact of reduced heart rate variability on risk of cardiac events. *Circulation*, 94: 2850-55, 1996.

TURNOVSKA, T.H, MANDADIZHIEVA, S.K., MARINOV, B.I. KOSTIANEV, SS. Respiratory and cardiovascular functions among smoking and nonsmoking girls from two regions with different air pollution degree. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210(1): 61-8, 2007.

VILLARREAL-CALDERON, A.; ACUNA, H; VILLARREAL-CALDERON, J; GARDUNO, M.; HENRIQUEZ-RODAN, C.F.; CALDERON-GARCIDUENAS, L.; VALENCIA-SALAZAR, G. – Assessment of physical education time and after-school outdoor time in elementary and middle school students in south Mexico-City: the dilemma between physical fitness and the adverse health effects of outdoor pollutant exposure. – *Archives in Environmental Health*, 57(5): 450-460, 2002

VIÑA J, GOMEZ-CABRERA MC, LLORET A, MARQUEZ R, MIÑANA JB, PALLARDÓ, FV. Free radical in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 50:271-277, 2000.

VINCENT, H.K., MORGAN, J.W., VINCENT, K.R. - Obesity exacerbates oxidative stress levels after acute exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 36(5): 772-779, 2004.

VOLPINO, P., TOMEI, F., VALLE, C.L., ROSATI, M.V., CIARROCA, M., SIO, S.D., CANGEMI, B., VIGLAROLO, R., FEDELE, F. – Respiratory and cardiovascular function at rest and during exercise testing in a healthy working population: effects of outdoor traffic air pollution. *Occupational Medicine*, 54: 475-482, 2004.

WHIPP, B.J., WASSERMAN, K. – Lung biology in health and disease: Exercise Physiology and Pathophysiology. Ed. Marcel Dekker, Inc.: New York, USA, vol. 52, 1991.

WHO Regional Publications, European Series, No. 91. Air quality guidelines for Europe; second edition, 2000.

WHO. Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide: Global update, summary of risk assessment. 2005.

WILLIAMS, M. – Air pollution and policy – 1952-2002 – *Science of the Total Environment*, 334-335: 15-20, 2004.

ZANOBETTI, A., CANNER, M.J., STONE, P.H., SCHWARTZ, J., SHER, D., EAGAN-BENGTSON, E., GATES, K.A., HARTLEY, L.H., SUH, H., GOLD, D.R. Ambient pollution and blood pressure in cardiac rehabilitation patients. *Circulation*, 110(15): 2184-2189. 2004.

ZAREBA, W.; NOMURA, A.; COUDERC, J.P. – Cardiovascular effects of air pollution: what to measure ECG? – *Environmental Health Perspects*. 109(4): 533-538, 2001.

ZEKA, A., ZANOBETTI, A., SCHWARTZ, J. – Individual-level modifiers of the effects of particulate matter on daily mortality. *American Journal of Epidemiology*, 163: 849-859, 2006.

ZIELINSKA, B. – Atmospheric transformation of diesel emissions. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57: 31-42, 2005

ZIEMACKI, G., CATTANI, G., CUSANO, M.C., STACCHINI, G. MARCONI, A.-  
Contenuto di metalli nelle varie frazioni dimensionali di materiale particolato. *Annali Dell'Istituto Superiore di Sanit*, 39(3): 371-9, 2003.

#### **4. ARTIGO 1**

### **LUNG OXIDATIVE STRESS INDUCED BY PARTICULATE MATTER DURING EXERCISE: “REAL WORLD EXPOSURE VERSUS RESIDUAL OIL FLY ASH INSTILLATION**

Thiago Gomes Heck, Marcelo Rafael Petry, Alexandre Maslinkiewicz, Pedro Dall’Ago, Claudia Ramos Rhoden

Post-Graduation Course in Medical Sciences and Laboratory of Oxidative Stress and Atmospheric Pollution. Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA). Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence:

Cláudia Ramos Rhoden

Rua: Jaraguá, 370/302 – Bairro Bela Vista – Porto Alegre – RS.

CEP: 90450-140. Brazil

Phone: 55-51-33038801

e-mail: [crhoden@ffcmpa.edu.br](mailto:crhoden@ffcmpa.edu.br)

Page proofs should be sent to Cláudia Ramos Rhoden

## ABSTRACT

Particulate matter inhalation is associated with increase of hospital admissions, morbidity and mortality in polluted cities. Oxidative stress is described as one mechanism that induces particle lung damage. Physical exercise is usually prescribed in order to promote physical health. However, one exercise session increases lung free radical production. The proposal of this study was to verify the lung oxidative stress caused by particles during exercise and to compare it to a resting condition. Methods: Wistar, adult rats were exposed to two experimental conditions: “real world” exposure and ROFA instillation. In the “real world” condition, rats swam during 20 or 60 minutes (P20 and P60 groups n=12 and n=8 respectively) with simultaneous exposure to air of Porto Alegre, Brazil. Control group exercised in the same condition while breathing filtrated air (F20 and F60 groups n=12 and n=8 respectively). In ROFA instillation protocol rats received 500µg/100µL of ROFA or 100µL saline intratracheally and exercised (swimming) for 20 minutes (Ex-S and Ex-RF groups, respectively) or were maintained in rest during the same time (R-S and R-F). In both protocols, after the exercise, blood lactate concentrations (LAC) were measured and rats were decapitated to remove the lung. Homogenates of lungs were processed and oxidative stress was evaluated by Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS: mmol MDA/mg protein), Chemiluminescence (CL: cps/mg protein) and Catalase activity (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/sec/mg protein). Results: PM exposure and ROFA did not interfere in LAC. In “real world” protocol PM exposure did not promote lung oxidative stress, while ROFA protocol showed that instillation of particles induced an increase of oxidative stress (TBARS: R-S=0.041±0.008; R-RF=0.066±0.011, Ex-S=0.054±0.01 and

Ex-RF=0.076±0.017, p<0.05) (CL: R-S=3728±711; R-RF=5131±470, Ex-S=5610±1872 and Ex-RF=6276±525, p<0.05) and these effects were more pronounced in exercise group. Our data suggests that PM can increase lung oxidative stress induced by physical exercise dependently of particles concentration.

**Key words: Oxidative stress, exercise, lung, particulate matter, pollution**

## INTRODUCTION

Particulate matter air pollution consists of solid and liquid particles derived from vehicle emissions, forest fire, domestic, agriculture and industrial pollutants (ZIELINSKA, 2005). They are classified depending on their size into coarse particles (PM<sub>10</sub>, diameter 2.5-10µm), fine particles (PM<sub>2.5</sub>, diameter < 2.5µm) and ultrafine particles (PM<sub>0.1</sub>, diameter < 0.1 µm). Comparing to coarse particles, fine and ultrafine particles deposit into deeper regions of lung and have a high potential of impact on health. (BELL *et al.*, 2006; ZEKA *et al.*, 2006).

In the last years, many studies have shown that air pollution is related to hospital admissions, illness and death related to pulmonary function alterations, especially of paediatric and elderly people (FARHAT *et al.*, 2005). Daily variation of PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>0.1</sub> may lead to an increase in the epithelial barrier permeability of lungs (TIMONEN *et al.*, 2004), affect respiratory function (DELFINO *et al.*, 2004; VOLPINO *et al.*, 2004; TIMONEN *et al.*, 2002; PETTINEN *et al.*, 2001) producing proinflammatory responses (MAZZARELLA *et al.*, 2007; SALVI *et al.*, 1999) and alveolar damage (GHIO *et al.*, 2001).

Numerous reports link oxidative stress to PM-induced adverse effects on the respiratory system (RHODEN *et al.*, 2004; HATZIS *et al.*, 2006; GURGUEIRA *et al.*, 2002; PINHO *et al.*, 2005; AAM *et al.*, 2007; GONZALEZ-FLECHA, 2004). PM has the intrinsic ability to induce oxidative stress and it is largely mediated by transition metal adsorbed at its surface. These metals generate hydroxyl radicals that are able to induce cellular damage. In addition, PM can also stimulate oxidative stress mediated by

transcription factors which act on genes regulating proinflammatory cytokines and adhesion molecules to enhanced the generation of inflammatory mediators and the recruitment of inflammatory cells (AAM *et al.*, 2007; SULLIVAN *et al.*, 2007; IMRICH *et al.*, 2007). In this sense, Gurgueira *et al.* (2002) showed an increase of oxidative stress in lung of rats exposed to concentrated air pollution (CAPs) for 3 hours. A similar effect was found after exposure to 30 minutes of residual oil fly ash (ROFA –ultrafine particles rich in transition metals) instillation.

Exercise is a common practice for health life style, and represents a non pharmacological therapy for prevention of cardiorespiratory diseases. However, there are three reasons why exercise is a special condition to be considered a risk to inhaling pollutants: proportional increase in amount of pollutants inhaled with increase in minute ventilation during exercise; a larger fraction of air inhaled through the mouth that not pass by normal nasal mechanisms of filtration; and the increase of velocity flow can carrier pollutants deeper into respiratory tract (CARLISLE & SHARP, 2001). Many athletic fields and school playgrounds are adjacent to high traffic roadways and may present long-term health risks for exercising children and young adults (VILLARREAL-CALDERON *et al.*, 2002).

The aim of this study was to verify the effect of acute exercise session and simultaneously exposure to ambient particulate matter or intratracheal ROFA instillation in oxidative stress parameters of the lung.



## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals**

Wistar male, adult rats, from the Animal Facility of the Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre were used. The animals were kept in plastic cages (47 cm x 34 cm x 18 cm) under controlled humidity (75-85%), temperature (22<sup>0</sup>+2<sup>0</sup>C), dark-light cycle of 12 hours (lights on from 7 a.m. to 7 p.m.) and were fed with a conventional laboratory diet (Supra-lab, Alisul Alimentos S.A, Brazil) and water *ad libitum*.

### **Animal care**

The authors assure that the study was conducted in accordance with National and Institutional Guidelines for Animal Welfare. All animals used in the research were treated humanely, with due consideration to the alleviation of distress and discomfort. This protocol was approved by the Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas Ethical Committee for Research (CPA 017/05).

### **ROFA Characterization**

ROFA consisted of particles retained in the electrostatic precipitator installed in one of the chimneys of a large steel plant localized in São Paulo city, Brazil. The element composition of ROFA suspension particles was determined by neutron activation analysis. Basically the procedure involved short irradiations of 5 min for the determination of Cl meaning chlorine; K, potassium; Mn, manganese; Na, sodium and

Sr, strontium using a pneumatic transfer system facility under a thermal neutron of  $1.4 \times 10^{12} \text{ ncm}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Longer irradiations of 16 h under a thermal neutron flux of about  $10^{12} \text{ ncm}^{-2}\text{s}^{-1}$  were performed for determinations of As meaning arsenic; Ba, barium; Ca, calcium; Ce, cerium; Cr, chromium; Co, cobalt; K, potassium; La, lanthanum; Mn, manganese; Na, sodium; Rb, rubidium; Sb, antimony; Sc, scandium; Th, thorium; V, vanadium and Zn, zinc. After adequate decay times, the irradiated samples and standards were measured using a hyperpure detector Model GX2020 coupled to Model 1510 (Perkin Elmer Ortec, Oak Ridge TN, USA) integrated signal processor, both from Canberra Corporate Headquarters (Meriden CT, USA). Counting times from 200 to 50,000 s were used, depending on the half-lives or activities of radioisotopes considered. The radioisotopes measured were identified according to their half-lives and  $\gamma$ -ray energies. The concentrations of the elements were calculated using a comparative method. Measurements of the diameters of the particles (largest diameter) were made using an integrating eyepiece with polarized light microscopy. Each line in the eyepiece represented a 10  $\mu\text{m}$  length at a magnification of 1000 x. About 230 events for each particle were measured (MEDEIROS *et al.*, 2004).

Particles of ROFA presented 44.6+0.1% of iron; bromine, 1.482+19  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; cesium, 16.3+0.3  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; cobalt, 9.90+0.25  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; chromium, 107.7+1.4  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; lanthanum, 10.3+0.1  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; manganese, 3,884+24  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; rubidium, 719.7+1.0  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; antimony, 2.27+0.9  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; arsenic, 154.4+0.8  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; vanadium, 35+4  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; zinc, 491.9+3.1  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Almost all particles had a diameter of less than 10  $\mu\text{m}$ ; the means and standard deviations were 1.7+2.56  $\mu\text{m}$  for carbon; 1.2+2.24  $\mu\text{m}$  for transition metals

particles. About 78% of carbon particles and 98% of transition metals particles had a diameter less than 2.5  $\mu\text{m}$  (MEDEIROS *et al.*, 2004).

### **Adaptation to the water**

All rats were adapted to the water before the beginning of experiments. The adaptation consisted of keeping the animals during ten minutes in shallow water at 30°C, for three consecutive days. This procedure had the objective to reduce the rat behavior stress related to its contact with water. Physical training was not allowed with this intervention. The experiments started 24 hours after the adaptation period.

### **Site of “Real World” Exposure**

Inhalation chambers were located on the second floor of the Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre Building, located in Porto Alegre (30°03'45”S, 51°11'15”W), downtown, at a crossroad with heavy traffic, facing an automated air pollution monitoring station of the State Environmental Agency, that provides continuous PM<sub>10</sub> measurements (beta monitor). Porto Alegre has a population of approximately 1.5 million inhabitants; it is the central city of a metropolitan industrialized area of 3.2 million inhabitants. The vehicle fleet was of 522.555 vehicles in March 2004 (BNDES, 2003), approaching 1 vehicle for every 2.7 individuals, and there is a significant increased of 4.5% vehicles by year. The vehicular traffic is the mainly source of air pollution in the bigger cities of Brazil, being responsible by approximately 90% of CO and PM<sub>10</sub> emissions, with the air pollution representing a serious problem in

many regions (SALDIVA, 1998). Porto Alegre has a 496.827 Km<sup>2</sup> of total area, with 40% of the urban area occupied by the transportation structure (BNDES, 2003). This city presents thermal inversions frequently and defined climate seasons. In average the temperature varies from 18 and 25°C, and the average of rain days varying from 3 to 6 days/month (based on 8 years of historical weather readings) (climate zone <http://www.climate-zone.com/climate/brazil/fahrenheit/porto-alegre.htm>).

### **Chamber of exercise and “Real World” exposure**

The protocol of swimming exercise simultaneously to air pollution exposure was carried through with the animals inside of acrylic chambers (30cm x 100cm x 30cm), filled 45cm with water at 30°C, hermetically closed, with the exception of one entrance (connected to the outdoor environment) and one exit. A vacuum pump was connected to the exit and pumped outdoor air through the exposure chambers at a flow rate of 10 liters per minute. One of the chambers (designated as filtered groups) received a 37mm Teflon filter (Millipore, Ireland) in the inlet, thus avoiding the admission of ambient particles major than 2.5µm, whereas the other received atmospheric air without the filter system (designed as polluted groups).

### **Protocols**

#### **“Real world”**

Forty rats were divided into four groups: F20 (n=12)= exercise in filtered air for 20min; F60 (n=8) = exercise in filtered air for 60min; P20 (n=12)= exercise in polluted air for 20min and P60 (n=8) = exercise in polluted air for 60min. At the end of the

exercise session caudal venous lactate concentration was measured and immediately after the rats were decapitated and the lungs were quickly removed and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for TBARS, CL and CAT activity evaluation.

### **Intratracheal ROFA instillation**

Twenty -four rats (8 per group) were intratracheally instilled with  $100\mu\text{L}$  saline or  $500\mu\text{G}/100\mu\text{L}$  ROFA suspension and divided into four groups : Rest Saline (R-S); Rest ROFA (R-RF); Exercise Saline (EX-S) and Exercise ROFA (EX-RF). All of administrations were performed under light anesthesia with ether. Swimming exercise was performed for 20 minutes into chamber filled 45cm with water at  $30^{\circ}\text{C}$ . Rats in resting condition were maintained for 20 minutes into chamber filled 5cm with water at the same temperature. Immediately after the experiment, caudal venous lactate concentration was measured and the animals were decapitated and the lungs were quickly removed and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for TBARS, CL and CAT activity evaluation.

### **Blood lactate concentration**

Blood samples ( $\sim 25\mu\text{L}$ ) were collected from caudal vein. The lactate concentrations were determined in Lactate Analyzer (Accutrend<sup>®</sup> Lactate, Roche) and expressed as mmol of lactate/ liter.

### **Tissue preparation**

The lung from each rat was excised, washed in saline solution and quickly frozen in liquid nitrogen. For determination of oxidative stress parameters, tissue samples were

homogenized in 5 volumes of 120mmol KCl, 30mmol sodium phosphate buffer (pH=7.4) added with protease inhibitor 0.5mmol PMSF (Phenylmethanesulfonyl Fluoride) at 0-4°C. The suspensions were centrifuged at 600g for 10 min at 0-4°C to remove nuclei and cell debris. The pellets discarded and the supernatants were used as homogenates.

### **Chemiluminescence**

Chemiluminescence was measured in a liquid scintillation counter in the out-of-coincidence mode (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer 1215, LKB - Produkter AB, Sweden). Lung homogenates were placed in low-potassium vials at a protein concentration of 0.5–1.0mg of protein/mL in a reaction medium consisting of 120mmol/L KCl, 30mmol/L sodium phosphate buffer (pH=7.4). Measurements were started by the addition of 3mmol/L *tert*-butyl hydroperoxide and the data expressed as counts per second per milligram of protein.

### **Thiobarbituric acid reactive substances method (TBARS) - Lipid peroxidation**

Homogenates were precipitated with 10 % TCA, centrifuged, and incubated with thiobarbituric acid (Sigma, Chem. Co.) for 60 minutes at 100°C. TBARS were extracted using butanol (1:1 V/V). After centrifugation, the absorbance of the butanol layer was measured at 535nm (BUEGE & AUST, 1978). The amount of TBARS formed was expressed in nanomoles of malondialdehyde per milligram of protein. Malondialdehyde standards were prepared from 1,1,3,3,-tetramethoxypropane.

**Catalase enzyme activity**

Catalase activity was determined by following the decrease at 240 nm-absorbance in a reaction medium containing 50mmol/L sodium phosphate buffer (pH=7.2), and 10mmol/L hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (AEBI, 1984). It was expressed as picomole of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduced per second per milligram of protein.

**Protein measurement**

Protein was measured by the method of Bradford (BRADFORD, 1976), using bovine serum albumin (1mg/mL) as standard. The results were expressed in mg of protein/mL.

**Statistical analysis**

One Way-ANOVA test was used for the statistical analysis of data of blood lactate concentration and all oxidative stress parameters evaluation (TBARS, CL, CAT). *Post hoc* Multiple comparison between groups were done with the Student Newman Keuls Test. The results were presented as the mean  $\pm$  standard deviation and the level of significance was set at 5%. All statistical analyses were performed using the Sigma-Stat 2.0 Software (Jandel Corporation, 1992-1995).

## RESULTS

### “Real World” exposure

Rats submitted to swimming exercise for 20 minutes presented higher blood lactate levels as compared with rats exercised for 60 minutes ( $p<0.05$ ). The exposure to ambient air particles did not change this measure (Figure 1).

As indicated in the Figure 2 (A and B), rats who performed exercise session for longer time (60 minutes) showed an increase of lipid peroxidation detected by CL, independently of ROFA treatment ( $p<0.05$ ). However, malondialdehyde levels were similar in all of treatment groups ( $p>0.05$ ). Acute exercise increased CAT activity only in the group submitted to filtered air for 60 minutes ( $p<0.05$ ) (Figure 2 C).

### Intratracheal instillation

Swimming exercise for 20 minutes promoted an increase of LAC (mmol/L) in Saline (R-S=1.82±0.41 at rest and Ex-S=4.01±0.83 after exercise) when compared to ROFA (R-RF=1.78±0.63 at rest and Ex-RF=4.08±0.76 after exercise) groups ( $p<0.05$ ). ROFA instillation did not change these findings (Figure 3).

As demonstrated in Figure 4(A), in terms of lipid peroxidation parameters rats treated with ROFA presented an increase of malondialdehyde levels as compared to saline groups independently of exercise condition. However, chemiluminescence measurement detected an increase of lipid peroxidation in both groups of rats submitted to exercise as well as in group treated with ROFA in resting condition (Figure 4B). Catalase activity was increased in rats treated with ROFA in resting condition or exercised without ROFA treatment ( $p<0.05$ ) (Fig 4C).



## DISCUSSION

Some studies have shown that exercising people are more susceptible to adverse effects of PM than sedentary people (VOLPINO *et al.*, 2004; SHARMAN *et al.*, 2004; CARLISLE & SHARP, 2001; GRIEVINK *et al.*, 1998). The exercise metabolism, with ventilatory rate and oxygen consumption higher than rest values, could be associated with PM airway deposition. Ultrafine inhaled particles accumulated in the lungs are able to translocate from the airways into the bloodstream causing systemic inflammation via oxidative stress (NEMMAR *et al.*, 2007). In addition, the interaction between pollutants and lung cells may increase the levels of proinflammatory cytokines resulting in oxidative stress and/or changes in autonomic nervous system (RHODEN *et al.*, 2005; GURGUEIRA *et al.*, 2002, GONZALEZ-FLECHA, 2004).

The majority of experimental studies regarding adverse effects of PM are conducted with rats in resting condition. In the current study we used rats in exercise condition, being imperative to determine the intensity of exercise performed by our animal groups. As suggested by the literature, the blood lactate concentration was used to mark the intensity of exercise (GOBBATO *et al.*, 2001). Kramer *et al.* (1993) and Gobbato *et al.* (2001) determined that values of blood lactate concentration around 2mmol/L are indicative of rest condition and values at 5.5mmol/L indicate high intensity exercise. In this study, we found higher blood lactate levels in the group of rats submitted to 20 minutes swimming exercise as compared with the 60 minutes exercise group in the “real world” exposure protocol. Probably, during the 20 minutes exercise, the rats exercised in more intensity conditions, because it was possible to observe they were more

active when they exercised for 60 minutes. These results could be explained due some adaptation of rats to this adverse condition, resulting in slowly movements, independently of pollutant exposure. When we analyzed data of ROFA instillation protocol, we found 2-fold increase in lactate concentration after exercise, indicating that rats reached moderate intensity lactate levels independently of treatment groups (GOBBATO *et al.*, 2001). However, the rats of rest groups presented lactate levels higher than recommended by the literature (KRAMER *et al.*, 1993; GOBBATO *et al.*, 2001). One hypothesis to explain this result could be the influence of ether anesthesia, which increases the blood lactate levels until 60 minutes after its administration (FREGOSI & DEMPSEY, 1986).

The oxidative stress imposed by PM exposure is associated with the lung inflammation and toxicity. Pre-treatment with N-acetylcysteine (NAC) prevented these biological effects (RHODEN *et al.*, 2004). Increased lung oxidative stress in animals exposure to PM (in resting condition) is well documented in the literature (GURGUEIRA *et al.*, 2002; RHODEN *et al.*, 2004). Recent findings of our laboratory demonstrated higher levels of the lung lipid peroxidation in rats exposure to PM for 24 hours (average=  $130 \pm 10.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) in “real world” model (PEREIRA, 2006). In this study we did not detect changes of this variable, probably due short-term PM exposure (20 or 60 minutes) and lower PM concentration during experiment (average=  $51.8 \pm 34.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , Table 1.). In terms of physical exercise, we showed that longer duration of exercise produced an increase of lipid peroxidation in the lung independently of PM exposure. Regarding antioxidant enzyme, catalase activity presented increased in according with exercise demand only in rats that were submitted to filtered air. This result is in

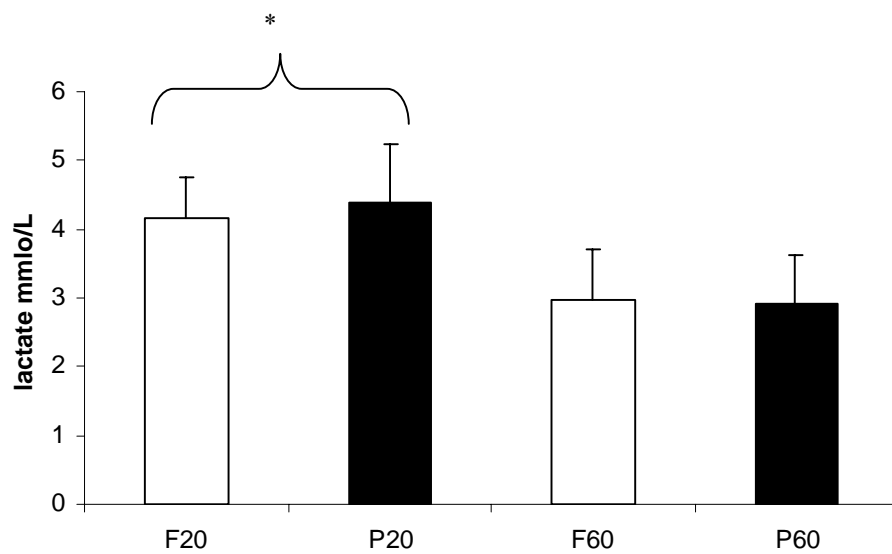
agreement with Somani *et al.*, (1995) that demonstrated that exercise *per se* increases mitochondrial CAT activity by 358%. The absence of this finding in the pollutant group could be indicate in some consumption of this enzymatic defense by PM.

ROFA produces a significant increase of cell membrane lipid peroxidation of lung of rats maintained in resting condition. Other studies that used similar doses of ROFA showed that this pollutant promotes acute inflammatory response mediated by oxidants (RHODEN *et al.*, 2004; PINHO *et al.*, 2005). In addition, we detected similar effects of ROFA in rats submitted to physical exercise. The aggregation of exercise and pollutant promoted an increase in accumulation of TBARS, suggesting that the association of these two conditions could lead to stronger lung oxidative damage. In agreement with other authors ROFA instillation promoted an increase of CAT activity in resting condition rats (GURGUEIRA *et al.*, 2002). In addition, our results corroborate the literature findings which demonstrate that exercise also increases the activity of this enzyme (SOMANI *et al.*, 1995). However, ROFA treatment abolished this effect in exercising group. Our findings could reinforce the idea that PM inhalation promotes a consumption of antioxidant enzyme, as described in “real world” protocol.

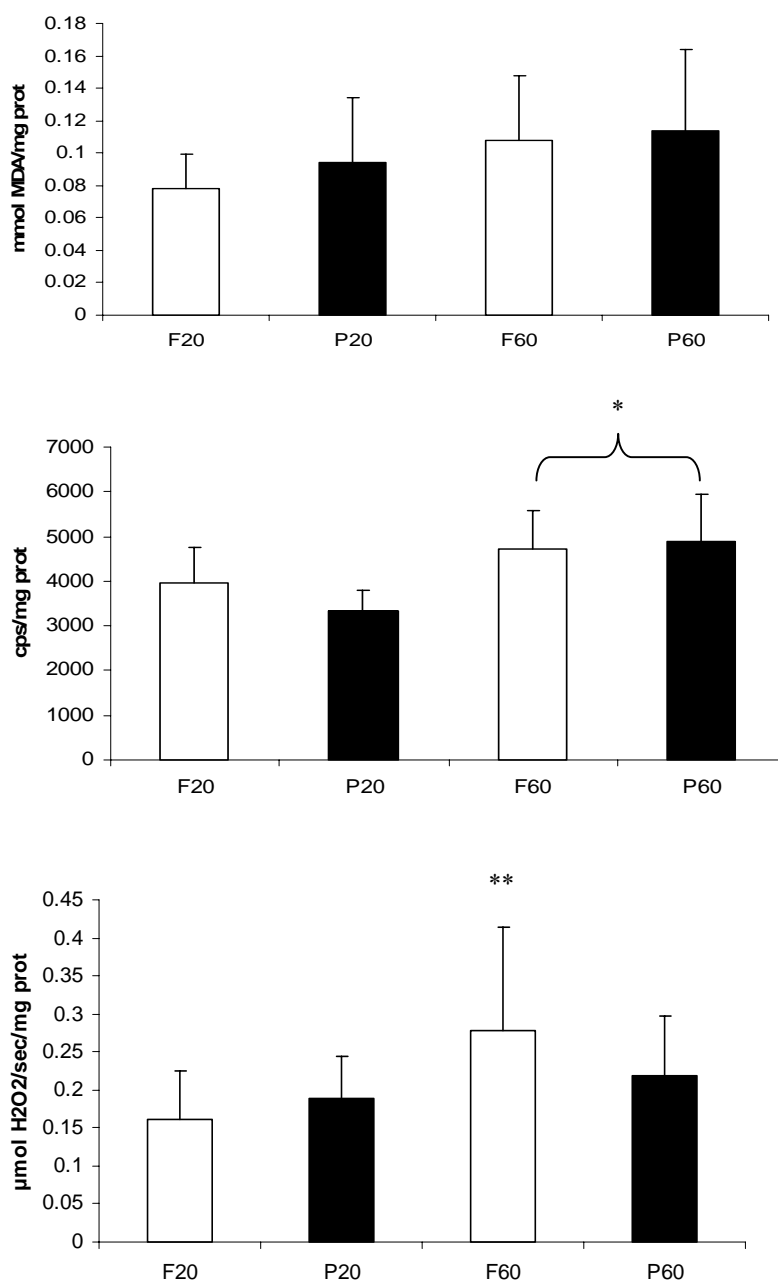
In conclusion, our data demonstrate that PM can promote lung oxidative stress during exercise. More studies including exercise intensity variations, longer or exhaustive protocols with simultaneous PM exposure may elucidate the health risk of this association.

Table 1. Particulate Matter Concentration - Day by Day of “Real World” Exposure

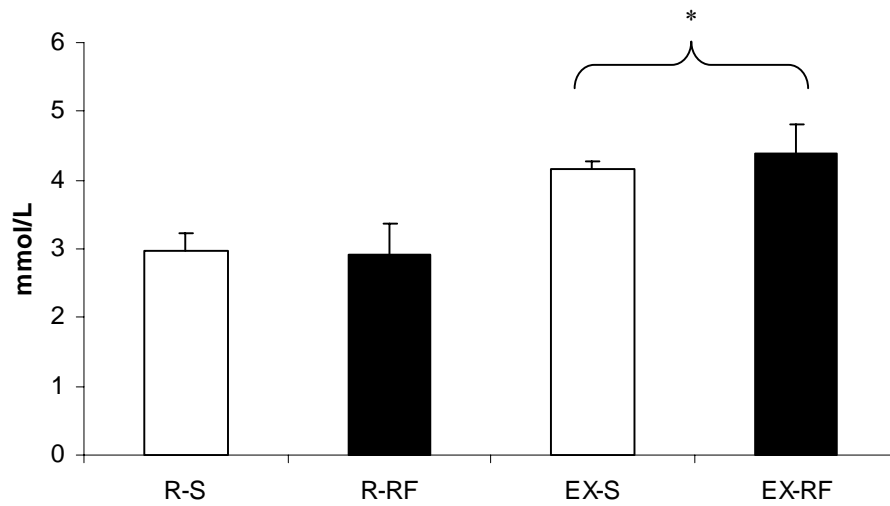
Date	Time of exposure	[PM] $\mu\text{g}/\text{m}^3$
June/24/2005	20 minutes	70.03
July /9/2005	20 minutes	38.15
July/14/2005	20 minutes	102.38
August/11/2005	60 minutes	28.42
September/2/2005	60 minutes	19.99



**Figure 1. Venous lactate concentration of rats after exercise for 20 or 60 minutes and exposed to particulate matter in “real world”. Values represent the mean  $\pm$  standard deviation of 12 rats in F20 and P20 groups and 8 rats in F60 and P60 groups. \* Statistical significance as compared to F60 and P60 groups ( $F_{(3,36)} = 8.08$ ,  $p < 0.05$ ) One way-ANOVA, followed by the Student Newman Keuls Test. (F20= 20 minutes exercise + filtered air; P20=20 minutes exercise + pollutant; F60= 60 minutes exercise + filtered air; P60=60 minutes exercise + pollutant)**



**Figure 2. Malondialdehyde concentration (A), chemiluminescence (B) and catalase activity (C) of lung of rats after exercise for 20 or 60 minutes and exposed to particulate matter in “real world”. Values represent the mean  $\pm$  standard deviation of 12 rats in F20 and P20 groups and 8 in F60 and P60 groups. \* Statistical significance as compared to F20 and P20 groups ( $F_{(3,36)} = 8.26$ ,  $p < 0.05$ ); \*\* statistical significance as compared to F20 group ( $F_{(3,36)} = 3.44$ ,  $p = 0.027$ ). One way-ANOVA, followed by the Student Newman Keuls Test. (F20= 20 minutes exercise + filtered air; P20=20 minutes exercise + pollutant; F60= 60 minutes exercise + filtered air; P60=60 minutes exercise + pollutant)**



**Figure 3. Venous lactate concentration of rats after 20 minutes of exercise or rest condition followed by ROFA instillation Values represent the mean  $\pm$  standard deviation of 8 rats per group. \* Statistical significance as compared to R-S and R-RF groups ( $F_{(3,28)}=41.23$ ,  $p<0.05$ ) One way-ANOVA, followed by the Student Newman Keuls Test. (R-S = rest + saline; R-RF= rest + ROFA; EX-S= exercise + saline and EX-RF= exercise + ROFA)**

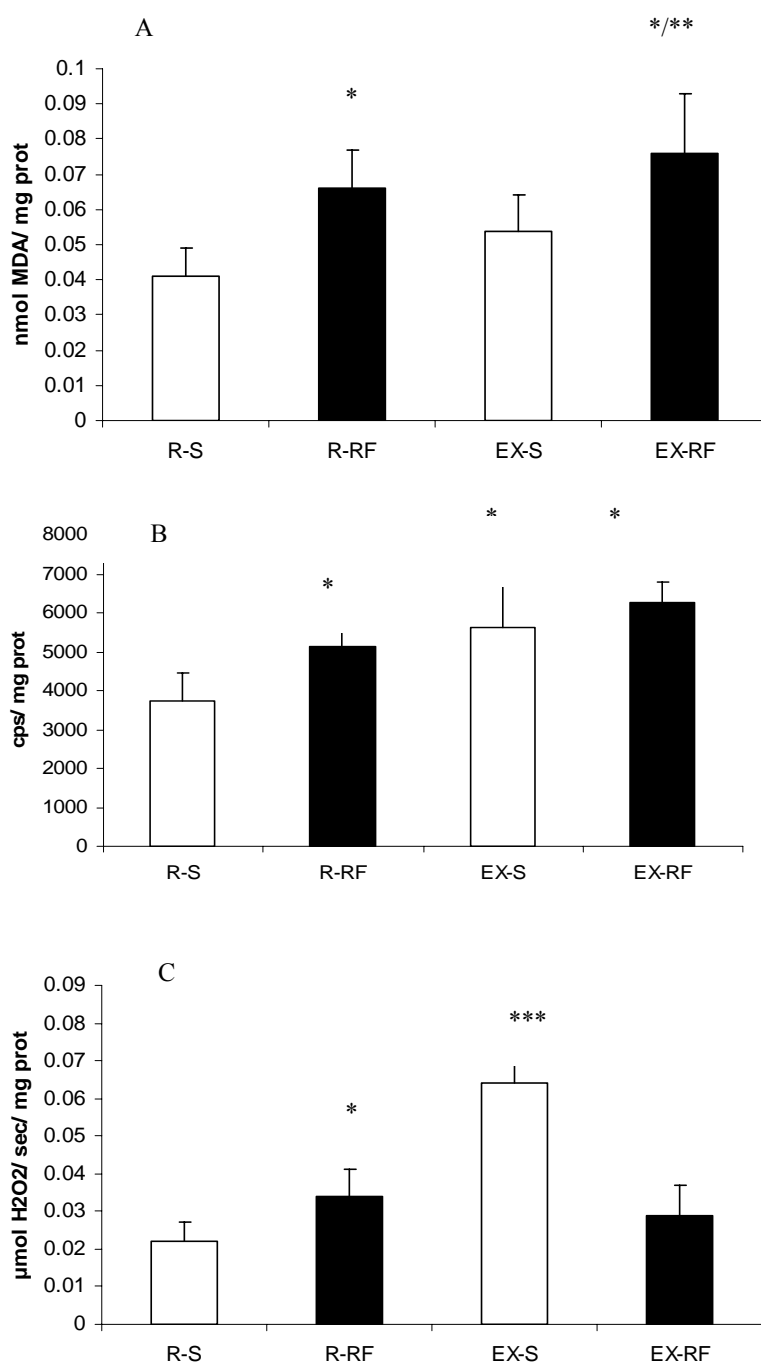


Figure 4. Malondialdehyde concentration (A), chemiluminescence (B) and catalase activity (C) of lung of rats submitted to 20 minutes of swimming exercise and instillate with ROFA. Values represent the mean  $\pm$  standard deviation of 8 rats per group. \* Statistical significance as compared to R-S group \*\* as compared to EX-S group; \*\*\* as compared to all other groups. One way-ANOVA, followed by the Student Newman Keuls Test, [(A)  $F_{(3,28)}=12.76$ ; (B)  $F_{(3,28)}=8.28$  (C)  $F_{(3,28)}=18.92$   $p<0.05$ ]. R-S = rest + saline; R-RF= rest + ROFA; EX-S= exercise + saline and EX-RF= exercise + ROFA



## REFERENCES

AEBI, H., Catalase in vitro, *Methods in Enzymology*, 105: 121–126, 1984.

AMM, B.B., FONNUM, F. –ROS scanenging effects of organic extract of diesel exhaust particles on human neutrophil granulocytes and rat alveolar macrophages. *Toxicology*, 230: 207-18, 2007.

BELL, M.L., DAVIS, D.L., GOUVEIA, N. BORJA-ABURTO, N.H, CIFUENTES, L.A.- The avoidable health effects of air pollution in three Latin American cities: Santiago, Sao Paulo, and Mexico City. *Environmental Research*, 100(3): 431-40, 2006.

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*, 72 : 248–254, 1976.

BUEGE, S.A.; AUST, S.D.- Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzimology*, 52:306-10, 1978.

CARLISLE, A.J., SHARP, N.C.C. Exercise and outdoor ambient air pollution. *British Journal of Sports Medicine*, 35: 214-222, 2001.

DELFINO, R.J., QUINTANA, P.J.E., FLORO, J., GASTANAGA, V.M., SAMIMI, B.S., KLEINMAN, M.T., LIU, J.S., BUFALINO, C., WU, C., McLAREN, C.E. – Association of FEV<sub>1</sub> in asthmatic children with personal and mircroenvironmental exporure to airborne particulate matter. *Environmental Health Perspectives*, 112(8): 932-941, 2004.

FARHAT, S.C., PAULO, R.L., SHIMODA, T.M., CONCEICAO, G.M., LIN, C.A., BRAGA, A.L., WARTH, M.P., SALDIVA, P.H. Effect of air pollution on peditric respiratory emergency room visits and hospital admissions. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, 38(2): 227-35, 2005.

FREGOSI, R.F., DEMPSEY, J.A. - Anesthetic effects on [H<sup>+</sup>]a and muscle metabolites at rest and following exercise. *Respiration Physiology*, 65(1): 85-98, 1986.

GHIO, J.A., GILBEY, J.G., ROGGL, V.L., RICHARDS, J.H., McGEE, J.K., CARSON, J.L., DEVLIN, R.B., CASCIO, W.E. – Diffuse alveolar damage after exposure to an oil fly ash. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164: 1514-18, 2001.

GOBBATO, C.A.; MELLO, M.A.; SIBUYA, C.Y.; AZEVEDO, J.R.M.; SANTOS, L.A.; KOKUBUN, E.- Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology, part A*, 130: 21-27, 2001.

GONZALEZ-FLECHA, B. – Oxidant mechanisms in response to ambient air particles. – *Molecular Aspects of Medicin*, 25:169-182, 2004.

GRIEVINK, L., JANSEN, S.M., VEER, P.V., BRUNEKREF, B. Acute effects of ozone on pulmonary function of cyclists receiving antioxidant supplements. *Occupational Environmental Medicine*, 55: 13-17, 1998.

GURGUEIRA, S.A.; LAWRENCE, J.; COULL, B.; MURTHY, G.G. K.; GONZÁLES-FLECHA, B. – Rapid increase in steady-state concentration of reactive oxygen species in lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environmental Health Perspectives*, 110: 749-755, 2002.

HATZIS, C., GODLESKI, J.J., GONZAÇEZ-FLECHA, B., WOLFSON, J.M., KOUTRAKIS, P. Ambient particulate matter exhibits direct inhibitory effects on oxidative stress enzymes. *Environmental Science Technology*, 40: 2805-11, 2006.

IMRICH, A., NING, Y.Y., LAWRENCE, J. COULL, B., GITIN, E., KNUTSON, M. KOBZIK, L. – Alveolar macrophage cytokine response to air pollution particles: oxidant mechanisms. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 218: 256-264, 2007.

KRAMER, K., DIJKSTRA, H., BAST, A. – Control of physical exercise of rats in a swimming basin. *Physiology and Behavior*, 53: 271-276, 1993.

MAZZARELA, G., FERRARACCIO, F., PRATI, M.V., ANNUNZIATA, S., BIANCO, A., MEZZOGIORNO, A., LIGUORI, G., ANGELILLO, I.F., CAZZOLA, M. – Effects of diesel exhaust particles on human lung epithelial cells: an in vitro study. *Respiratory Medicine, On Line*, 2007.

MEDEIROS, N. JR., RIVERO, D.H., KASAHARA, D.I., SAIKI, M., GODLESKI, J.J., KOUTRAKIS, P., CAPELOZZI, V.L., SALDIVA, P.H., ANTONANGELO, L. Acute pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition. *Environmental Research*, 95(1):62-70, 2004.

NEMMAR, A., AL-MASKARI, S., ALI, B.H., AL-AMRI, I.S. - Cardiovascular and lung inflammatory effects induced by systemically administered diesel exhaust particles in rats. *American Journal Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 292(3): L664-70, 2007.

PEREIRA, C.E.L. Estudo do estresse oxidativo e da resposta inflamatória pulmonar por exposição aguda ao material particulado e o papel da via do óxido nítrico. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em ciências médicas. Porto Alegre: Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, 2006.

PETTINEN, P., TIMONEN, K.L., TITTANEN, P., MIRME, A., RUUSKANEN, J., PEKKANEN, J. – Number of concentration and size of particles in urban air: effects on spirometric function in adults subjects. *Environmental Health Perspectives*, 109(4): 319-323, 2001.

PINHO, R.A., SILVEIRA, P.C.L., SILVA, L.A., STRECK, E.L., DAL-PIZZOL, F., MOREIRA, J.C.F. – N-acetylcysteine and deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. *Environmental Research*, 99: 355-60, 2005.

RHODEN, C.R.; LAWRENCE, J.; GODLESKI, J.J.; GONZÁLES-FLECHA, B. - N-acetylcysteine prevents lung inflammation after short-term inhalation exposure to concentrated ambient particles. *Toxicology Sciences* 79(2): 296-303, 2004.

RHODEN, C.R., WELLENIUS, G.A., GHELFI, E., LAWRENCE, J., GONZALEZ-FLECHA, B. - PM-induced cardiac oxidative stress and dysfunction are mediated by autonomic stimulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1725(3): 305-313, 2005.

SALDIVA, P.H.N.- Air pollution in urban areas: the role of automotive emissions as a public health problem *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2(11): 868-868, 1998.

SALVI, S., BLOMBERG, A., RUDELL, B., KELLY, F., SANDSTROM, T., HOLGATE, S.T., FREW, A. – Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust human volunteers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 159: 702-9, 1999.

SHARMAN, J.E., COCKCROFT, J.R., COOMBES, J.S. - Cardiovascular implications of exposure to traffic air pollution during exercise. *Quarterly Journal of Medicine*, 97: 637-643, 2004.

SOMANI, S.M., FRANK, S., RYBAK, L.P. – Responses of Antioxidant system to acute and trained exercise in rat heart subcellular fractions. *Pharmacology Biochemistry, and Behavior*, 51(4): 627-634, 1995.

SULLIVAN, J., HUBBARD, R., LIU, S., SHEPHERD, K., TRENGA, C.A., KOENIG, J.Q., CHANDLER, W.L., KAUFMAN, J.D. – A community study of the effect of particulate matter on blood measures of inflammation and thrombosis in elderly population. *Environmental Health*, 6 (3): On Line, 2007.

TIMONEN, K.L., HOEK, G., HEINRICH, J., BERNARD, A., BRUNEKREEF, B., DE HARTOG, J., HAMERI, K., IBALD-MULLI, A., MIRME, A., PETERS, A., TIITTANEN, P., KREYLING, W.G., PEKKANEN, J. -Daily variation in fine and ultrafine particulate air pollution and urinary concentrations of lung Clara cell protein CC16. *Occupational Environmental Medicine*, 61(11): 908-14, 2004.

TIMONEN, K.L.; PEKKANEN, J.; TITTANEN, P.; SALONEN, R.O. – Effects of air pollution on changes in lung function induced by exercise in children with chronic respiratory symptoms. *Occupational Environmental Medicine*, 59(2): 129-34, 2002.

VILLARREAL-CALDERON, A.; ACUNA, H; VILLARREAL-CALDERON, J; GARDUNO, M.; HENRIQUEZ-RODAN, C.F.; CALDERON-GARCIDUENAS, L.; VALENCIA-SALAZAR, G. – Assessment of physical education time and after-school outdoor time in elementary and middle school students in south Mexico-City: the dilemma between physical fitness and the adverse health effects of outdoor pollutant exposure. – *Archives in Environmental Health*, 57(5): 450-460, 2002.

VOLPINO, P., TOMEI, F., VALLE, C.L., ROSATI, M.V., CIARROCA, M., SIO, S.D., CANGEMI, B., VIGLAROLO, R., FEDELE, F. – Respiratory and cardiovascular function at rest and during exercise testing in a healthy working population: effects of outdoor traffic air pollution. *Occupational Medicine*, 54: 475-482, 2004.

ZEKA, A., ZANOBETTI, A., SCHWARTZ, J. – Individual-level modifiers of the effects of particulate matter on daily mortality. *American Journal of Epidemiology*, 163: 849-859, 2006.

ZIELINSKA, B. – Atmospheric transformation of diesel emissions. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57: 31-42, 2005.

## **5. ARTIGO 2**

### **RESIDUAL OIL FLY ASH INDUCES HEART OXIDATIVE STRESS WITHOUT HEMODYNAMIC ALTERATIONS DURING EXERCISE: AN EXPERIMENTAL STUDY IN RATS.**

Thiago Gomes Heck, Marcelo Rafael Petry, Alexandre Maslinkiewicz, Ramiro Barcos Nunes, Pedro Dall'Ago, Claudia Ramos Rhoden

Post-Graduation Course in Medical Sciences and Laboratory of Oxidative Stress and Atmospheric Pollution. Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA). Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence:

Cláudia Ramos Rhoden

Rua: Jaraguá, 370/302 – Bairro Bela Vista – Porto Alegre – RS.

CEP: 90450-140. Brazil

Phone: 55-51-33038801

e-mail: [crhoden@ffcmpa.edu.br](mailto:crhoden@ffcmpa.edu.br)

Page proofs should be sent to Cláudia Ramos Rhoden

## ABSTRACT

Background: Epidemiological studies have linked ambient particulate matter (PM) exposure to an increased cardiovascular diseases risk. The role of oxidative stress in this process is well documented in the literature. During exercise physiological cardiovascular changes occur, such as an increasing of free radical production. The aim of this study was to verify the PM effect in heart oxidative stress and hemodynamic parameters in rats submitted to acute exercise session. Methods: twelve Wistar, adult rats were divided into two treatment groups: Saline (100 $\mu$ L NaCl 0.9%) or ROFA (500 $\mu$ gROFA/100 $\mu$ L saline), which were administrated by intratracheal instillation. After treatment, rats were submitted to exercise session (20 minutes swimming) and heart rate (HR), systolic (SAP), diastolic (DAP) and mean arterial pressure (MAP) were recorded. Arterial lactate concentration (LAC) was measured before and after the exercise session. Homogenate of the heart tissue were processed for lipid peroxidation of the cell membranes (Thiobarbituric Acid Reactive Substances Test-TBARS and Chemiluminescence-CL) and catalase (CAT) activity evaluation. Results: In both groups blood LAC was increased 2-folds ( $p<0.05$ ) by the exercise session. Lipid peroxidation in ROFA group was significantly higher when compared to the control group (TBARS mmol MDA/mg protein: Saline=  $0.028\pm 0.006$  x ROFA= $0.049\pm 0.016$ ,  $p=0.03$ ); (CL cps/mg protein: Saline = $3600\pm 531$  x ROFA= $5202\pm 951$ ,  $p=0.015$ ) and CAT activity was similar in both groups (CAT activity  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/sec/mg protein : Saline=  $0.031\pm 0.003$  vs ROFA=  $0.027\pm 0.003$ ,  $p=0.087$ ). Conclusion: The current study in rats demonstrated that

ROFA instillation increased heart tissue oxidative stress but this effect was not associated with hemodynamic alterations during short-term and moderate intensity exercise.

**Key words:** Oxidative stress, exercise, heart, particulate matter, pollution, blood pressure, hemodynamic parameters

## INTRODUCTION

Epidemiological studies have linked ambient particulate matter (PM) exposure to an increase of cardiovascular complications (BROOK *et al.*, 2004). These studies report that exposures to PM could be associated with a first cardiovascular event (MILLER *et al.*, 2007), hospital readmissions (KLOT *et al.*, 2005) and increase of blood pressure in preexisting cardiac disease patients (ZANOBETTI *et al.*, 2004), and also an increase of risk of death for cerebrovascular and coronary heart diseases (MILLER *et al.*, 2007).

Experimental studies have demonstrated that the mechanisms by which PM inhalation promotes cardiovascular injuries may be related to direct and/or indirect actions. Ultrafine inhaled particles accumulated in the lungs are able to translocate from the airways into the bloodstream (NEMMAR *et al.*, 2007) causing systemic inflammation via oxidative stress, which mediates endothelial dysfunction and atherosclerosis (YAMAWAKI & IWAI, 2006), increase blood coagulability by activating platelets and coagulation factors such as fibrinogen. In addition, the interaction between pollutants and lung cells may signalize to heart by activation of pulmonary neural reflexes initiating changes in autonomic nervous system and/or increasing the levels of pro-inflammatory cytokines which result in increases of lipid peroxidation and antioxidants enzymes activity in the heart of rats (RHODEN, *et al.*, 2005; GURGUEIRA, *et al.*, 2002), as well as dysfunction of autonomic nervous system activity (GONZALEZ-FLECHA, 2004).

Chronic health effects of exercise activity sessions are reached by regular training and promote acute cardiovascular adaptation when the rest homeostasis is broked. During



exercise cardiovascular function may be changed according to type, intensity, duration of the exercise activity as well as the physical conditioning. Increase of heart rate is described in human and animal models during physical activity and it is considered an important variable associated with the intensity of exercise. The rate of reactive oxygen species generation in biological tissues is closely related to oxygen metabolism. During physical exercise occurs an increase of mitochondrial metabolism which is associated with enhanced oxygen consumption by the heart. Several studies showed increase of free radical production and antioxidants enzymes adaptations in the heart after acute exercise activity (KRAUSE *et al.*, 2007; GUL *et al.*, 2006; SOMANI *et al.*, 1995).

Even the impact of PM on athletic performance has not been well documented, systemic oxidative stress and inflammation induced by the pollutants particles may have a negative impact on cardiovascular function and can in some extension be related to physical performance (FLORIDA-JAMES *et al.*, 2004). Based in these hypothetical phenomenon, supplementation of antioxidants vitamins may have a protective effect against ozone air pollution on lung and heart function of individuals on physical activities (GRIEVINK *et al.*, 1998). Chronic exposure to outdoor traffic pollution has been suggested to be associated with decreases in physical efforts and maybe increases the risk of abnormal cardiovascular functionality during exercise (VOLPINO *et al.*, 2004).

Despite extensive literature on exercise, oxidative stress and oxidative stress induced by PM, few studies have investigated the heart effects of PM inhalation during exercise. Based in these aspects above discussed the aim of this study was to verify the

effect of PM on heart tissue oxidative stress and hemodynamic parameters of rats submitted to moderate and short-term exercise session.

## METHODS

### **Animal:**

Adult, Wistar male rats from Animal Facility of the Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre were used. Animals were fed with a conventional laboratory diet (Supra-lab, Alisul Alimentos S/A, Brazil) and water *ad libitum*. They were kept under controlled condition of temperature ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and 12 hours light/dark cycle.

### **Animal care:**

The authors assure that the study was conducted in accordance with National and Institutional Guidelines for Animal Welfare. All animals used in the research were treated humanely, with due consideration to the alleviation of distress and discomfort. This protocol was approved by the Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas Ethical Committee for Research (CPA 017/05).

### **Drugs**

Dopalen<sup>®</sup> (Ketamin 1.16g/10mL, Agribrands Ltda, Brazil) and Anasedan<sup>®</sup> (Xylazin 2,3g/100mL, Agribrands Ltda, Brazil), ROFA suspension (500 $\mu\text{g}$ /100 $\mu\text{L}$  NaCl 0.9%) or NaCl 0.9% were used.

### **Characterization of particles**

ROFA consisted of particles retained in the electrostatic precipitator installed in one of the chimneys of a large steel plant localized in São Paulo city, Brazil. The element composition of ROFA suspension particles was determined by neutron activation analysis. Basically the procedure involved short irradiations of 5 min for the determination of Cl meaning chlorine; K, potassium; Mn, manganese; Na, sodium and Sr, strontium using a pneumatic transfer system facility under a thermal neutron of  $1.4 \times 10^{12} \text{ ncm}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Longer irradiations of 16 h under a thermal neutron flux of about  $10^{12} \text{ ncm}^{-2}\text{s}^{-1}$  were performed for determinations of As meaning arsenic; Ba, barium; Ca, calcium; Ce, cerium; Cr, chromium; Co, cobalt; K, potassium; La, lanthanum; Mn, manganese; Na, sodium; Rb, rubidium; Sb, antimony; Sc, scandium; Th, thorium; V, vanadium and Zn, zinc. After adequate decay times, the irradiated samples and standards were measured using a hyperpure detector Model GX2020 coupled to Model 1510 (Perkin Elmer Ortec, Oak Ridge TN, USA) integrated signal processor, both from Canberra Corporate Headquarters (Meriden CT, USA). Counting times from 200 to 50,000 s were used, depending on the half-lives or activities of radioisotopes considered. The radioisotopes measured were identified according to their half-lives and  $\gamma$ -ray energies. The concentrations of the elements were calculated using a comparative method. Measurements of the diameters of the particles (largest diameter) were made using an integrating eyepiece with polarized light microscopy. Each line in the eyepiece represented a 10  $\mu\text{m}$  length at a magnification of 1000 x. About 230 events for each particle were measured (MEDEIROS et al, 2004).

Particles of ROFA presented 44.6±0.1% of iron; bromine, 1.482±19  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; cesium, 16.3±0.3  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; cobalt, 9.90±0.25  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; chromium, 107.7±1.4  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; lanthanum, 10.3±0.1  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; manganese, 3,884±24  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; rubidium, 719.7±1.0  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; antimony, 2.27±0.9  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; arsenic, 154.4±0.8  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; vanadium, 35±4  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; zinc, 491.9±3.1  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Almost all particles had a diameter of less than 10  $\mu\text{m}$ ; the means and standard deviations were 1.7±2.56  $\mu\text{m}$  for carbon; 1.2±2.24  $\mu\text{m}$  for transition metals particles. About 78% of carbon particles and 98% of transition metals particles had a diameter less than 2.5  $\mu\text{m}$ .

### **Tissue preparation**

The heart from each animal was excised, washed in saline solution and quickly frozen in liquid nitrogen. For determination of oxidative stress parameters, tissue samples were homogenized in 7 volumes of 120mM KCl, 30mM sodium phosphate buffer (pH=7.4) added with protease inhibitor 0.5mM PMSF (Phenylmethanesulfonyl Fluoride) at 0-4°C. The suspensions were centrifuged at 600g for 10 min at 0-4°C to remove nuclei and cell debris. The pellets discarded and the supernatants were used as homogenates.

### **Chemiluminescence**

Chemiluminescence was measured in a liquid scintillation counter in the out-of-coincidence mode (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer 1215, LKB - Produkter AB, Sweden). Heart homogenates were placed in low-potassium vials at a protein concentration of 0.5–1.0 mg of protein/mL in a reaction medium consisting of 120 mM/L KCl, 30mM/L sodium phosphate buffer (pH=7.4). Measurements were started

by the addition of 3mM/L *tert*-butyl hydroperoxide and the data expressed as counts per second per milligram of protein.

#### **Thiobarbituric acid reactive substances method (TBARS)**

Homogenates were precipitated with 10 % TCA, centrifuged, and incubated with thiobarbituric acid (Sigma, Chem. Co.) for 60 minutes at 100<sup>0</sup>C. TBARS were extracted using butanol (1:1 V/V). After centrifugation, the absorbance of the butanol layer was measured at 535nm (BUEGE & AUST, 1978). The amount of TBARS formed was expressed in nanomoles of malondialdehyde per milligram of protein. Malondialdehyde standards were prepared from 1,1,3,3,-tetramethoxypropane.

#### **Catalase enzyme activity**

Catalase (CAT) activity was determined by following the decrease at 240nm-absorbance in a reaction medium containing 50mM/L sodium phosphate buffer (pH=7.2), and 10mM/L hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (AEBI, 1984). It was expressed as picomole of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduced per second per milligram of protein.

#### **Protein measurement**

Protein was measured by the method of Bradford (BRADFORD, 1976), using bovine serum albumin (1mg/mL) as standard. The results were expressed in mg of protein/mL.

### **Arterial lactate concentration**

Arterial blood samples (~25 $\mu$ L) were collected from blood flow into catheter implanted in carotid arteria. The lactate concentrations were determined in lactate analyzer (Accutrend<sup>®</sup> Lactate, Roche) and expressed as mmol of lactate/ liter.

### **Hemodynamic data acquisition and analysis**

One catheter filled with 0.06 mL saline was implanted in anesthetized rats (85 mg/kg ketamin and 15 mg/kg xylazin) into the carotid artery (PE-10) for direct arterial pressure measurements. After the surgery rats were separated in individual cages and received food and water *ad libitum*. At the day of experiment the arterial cannula was connected to a strain-gauge transducer (P23Db, Gould-Statham), and blood pressure signals were recorded over 20 minutes at rest and for 20 minutes during exercise period by a microcomputer equipped with an analog-to-digital converter board (CODAS, 2-kHz sampling frequency; Dataq Instruments, Inc). The recorded data were analyzed on a beat-to-beat basis to quantify changes in systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP), mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR).

### **Adaptation to the water**

All rats were adapted to the water before the beginning of experiments. The adaptation consisted of keeping the animals during ten minutes in shallow water at 30°C, in three consecutive days. This procedure had the objective to reduce the rat behavior stress related to its contact with water. Physical training was not allowed with this intervention.

### **Experimental design and procedures**

One day after the adaptation period, the carotid was cannulated as described above. Twenty-four hours later, rest hemodynamic data were recorded and blood samples were obtained for arterial lactate concentration measurement. After, the rats were quickly and lightly anesthetized with ether for intratracheal instillation and divided into two groups: Saline (n=8) 100 $\mu$ L saline and ROFA (n=7) 500 $\mu$ G/100 $\mu$ L ROFA suspension. After ten minutes of instillation the rats from both groups were submitted to 20 minutes swimming exercise into a chamber filled 45cm with water at 30°C. Simultaneously to exercise, the register of hemodynamic parameters were recorded, as described. At the end of the exercise session, blood samples were obtained for arterial lactate concentration determinations, and immediately after the rats were decapitated and the heart was quickly removed and stored at -80°C for TBARS, CL and CAT activity evaluation.

### **Statistical analysis**

The results were expressed as the mean $\pm$  standard deviation for all variables. Unpaired Student T test was used to compare MDA concentration, chemiluminescence, catalase activity, and hemodynamic data between groups of treatment. Paired Student T test was used for arterial lactate concentration evaluation and hemodynamic parameters when compared rest and exercise conditions.

All statistical analyses were performed using the Sigma-Stat 2.0 Software (Jandel Corporation, 1992-1995). The level of significance was set in 5%.



## RESULTS

### **Arterial lactate concentration and heart tissue oxidative stress status**

Swimming exercise test for 20 minutes promoted an increase of arterial lactate levels (mM/L) in Saline ( $1.82 \pm 0.41$  at rest vs  $4.01 \pm 0.83$  after exercise) and ROFA ( $1.78 \pm 0.63$  at rest vs  $4.08 \pm 0.76$  after exercise) groups ( $p < 0.05$ ). ROFA instillation did not change this measure, demonstrated by similar increases in lactate levels after exercise compared with rest condition in ROFA and Saline groups.

As indicated in the Figures 1 and 2, rats treated with ROFA presented an increase of MDA levels ( $p = 0.03$ ) and CL evaluation ( $p = 0.015$ ) on heart tissue. However, catalase activity (Figure 3) was similar into the two groups ( $p = 0.087$ ).

### **Hemodynamic results**

Cardiovascular data are demonstrated in Table 1. The HR and DAP, SAP and MAP values were similar between the groups during rest condition. During exercise, there were no differences on hemodynamic data between the treatment groups. When compared rest and exercise condition, the HR values increased in exercise condition, while diastolic, systolic and mean arterial pressure decrease, independently of treatment. The magnitude of the increase of HR and the decrease of the arterial pressure were similar for the Saline and ROFA groups during the exercise.

## DISCUSSION

Although there are few studies in the literature (GRIENVICK *et al.*, 1998, FLORIDA-JAMES *et al.*, 2004; VOLPINO *et al.*, 2004) associating air pollution adverse effects with exercise, Sharman *et al.* (2004) published a recommendation to avoid exercise practice in parks or in recreational areas close to busy roadways or industrial sites. These authors also suggest useful to limit exercise session in terms of hours per day when air pollution is critical.

Increase of oxygen consumption, significant rise in pulmonary ventilation and diffusion capacity can be three important reasons for augmented risk to particles inhalation damage to cardiovascular system during exercise (SHARMAN *et al.*, 2004). It is demonstrated in the literature, that the total amount of ultrafine particles deposited in respiratory tract of humans during moderate exercise is approximately five times higher than in rest (DAIGLE *et al.*, 2003). Human studies demonstrated alterations in HR and HR variability, blood pressure and arrhythmic events, in patients with preexisting cardiovascular disease when exposed to PM in resting condition.

In this study an increased heart oxidative stress induced by PM inhalation was verified. More specifically, we observed that ROFA (fine ambient particles rich in metal transitions) instillation promoted an increase of lipid peroxidation in heart tissues of rats submitted to exercise activity. The fact that PM induces lipid peroxidation is not novel. Several authors, such as Gurgueira *et al.*, (2002); Rhoden *et al.*, (2004); and Rhoden *et al.*, (2005) demonstrated that pulmonary and cardiac adverse effects of PM might be mediated by mechanism dependent on oxidants. Although, in current study CAT activity

were similar in the treatment groups. This result is in disagreement with some authors who demonstrated protective effect of catalase in cardiac miocytes damage induced by diesel exhaust (OKAYAMA *et al.*, 2006) and an increase of 21% in catalase activity in heart tissue of rats exposed to concentrated ambient particles (CAPs) for 5 hours (GURGUEIRA *et al.*, 2002) The absence of increased CAT activity in our study maybe in some extension could be explained by the fact that acute exercise *per se* increases mitochondrial CAT activity by 358% as compared with rest condition (SOMANI *et al.*, 1995).

It is important to notice that all papers regarding oxidative stress and PM exposure were conducted with rats in resting condition. Our proposal is novel because we used rats in exercise condition, being imperative to determine the intensity of exercise performed by our animal groups. The literature suggests that the blood lactate concentration is a good marker of intensity of exercise (GOBBATO *et al.*, 2001). In the present study we found the rest lactate concentration was close to 2mmol/L, which is in agreement with other authors (KRAMER *et al.*, 1993; GOBBATO *et al.*, 2001). After exercise session we detected 2-fold increase in lactate concentration. Gobbato *et al.* (2001) demonstrated that maximal lactate steady state for sedentary rats submitted to acute swimming exercise occurs at 5.5mmol/L blood lactate concentration, which is an indicative that our rats reached moderate intensity exercise, independently of treatment group.

The idea that oxidants alter cardiac function is well documented by several authors in different studies (BERNIER *et al.*, 1986; FERREIRA *et al.*, 1989; MENASCHE *et al.*, 1986). Recently, it was demonstrated by Rhoden *et al.* (2005) that

sympathetic and parasympathetic blockers prevented CAPs-mediated cardiac adverse effects, showing the critical role for autonomic nervous system signaling in this damage. In the current study, unlikely that is described in the literature (RIVERO *et al.*, 2005; WELLENIUS *et al.*, 2002) ROFA instillation did not result in significant changes in heart rate, in systolic, diastolic and mean blood pressure. One reason for this disagreement may be related to the exercise condition. There are some controversial data in the literature regarding hemodynamic parameters in animal models of exercise. For example, Kramer *et al.* (1995) demonstrated an increase of HR in rats submitted to a swimming test. Yeung *et al.* (2006) found an increase in HR and SAP without alteration on DAP using a treadmill for 7 minutes. Evaluating cardiovascular responses during human exercise in water, Park *et al.* (1999) and Cider *et al.* (2006) found increases of HR and blood pressure when compared to resting condition. During water immersion at 30° of temperature, Park *et al.* (1999) showed 50% increase in cardiac output, although HR decreased in 15%. The water immersion modified other hemodynamic parameters such as an increase of 8% in SAP, 15% in DAP and decrease of 32% in total peripheral resistance. Other studies found decrease in blood pressure (CRAIG & DVORAK, 1966) or no significant alterations in these parameters (CIDER *et al.*, 2006; GABRIELSEN, *et al.*, 1993).

In the present study we observed that rats submitted to short-term moderate exercise activity increased HR in both groups independently if the rats were treated or not with ROFA when submitted to swimming exercise model. However, interestingly all of the measurements regarding blood pressure reduced with exercise and no differences between exposure groups were found. Sturek *et al.*, (1984) showed similar changes in

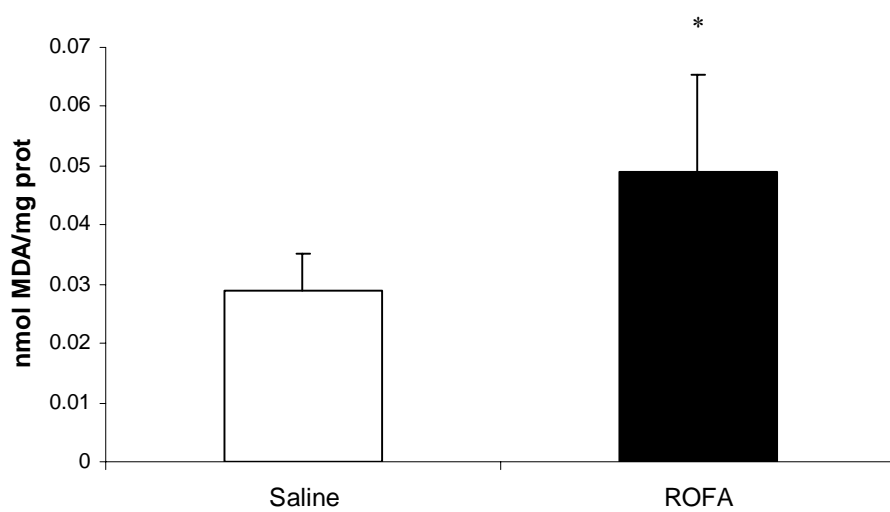
HR and PAM analysis in rats during swimming exercise and suggest that these effects occur in response to gradually parasympathetic influence that could be evoked by the frequent submerges of the animal.

In conclusion, our data suggest that PM inhalation during exercise may exacerbate the free radicals production in the heart tissue without producing physiological alterations on hemodynamic control.

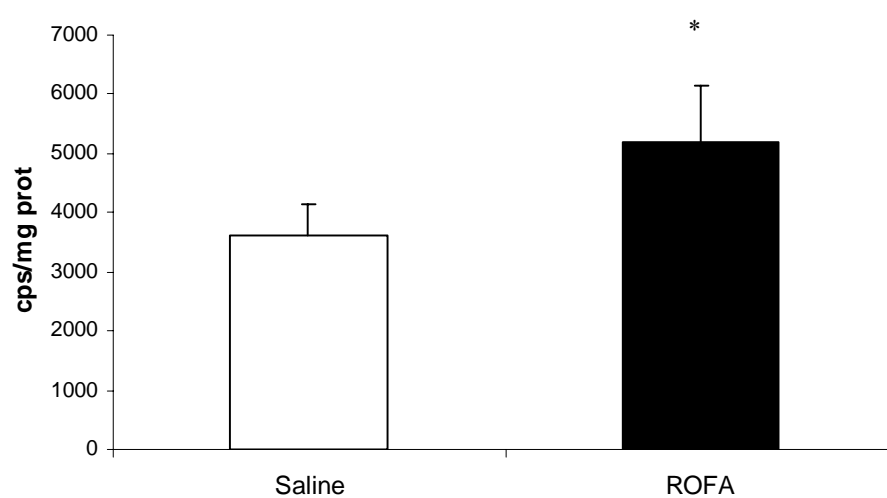
## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Brazil. T.G. Heck was supported by a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES; M.R. Petry was supported by FAPERGS; Dr C.R. Rhoden and Dr. P. Dall’Ago are supported by - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. The authors declare they have no conflict of interest.

Special thanks for technical assistance to the students of Laboratory of Atmospheric Pollution and Oxidative Stress – FFFCMPA, to Laboratory of Experimental Air Pollution –University of São Paulo and to Porto Alegre Ambient Protection State Foundation (FEPAM).

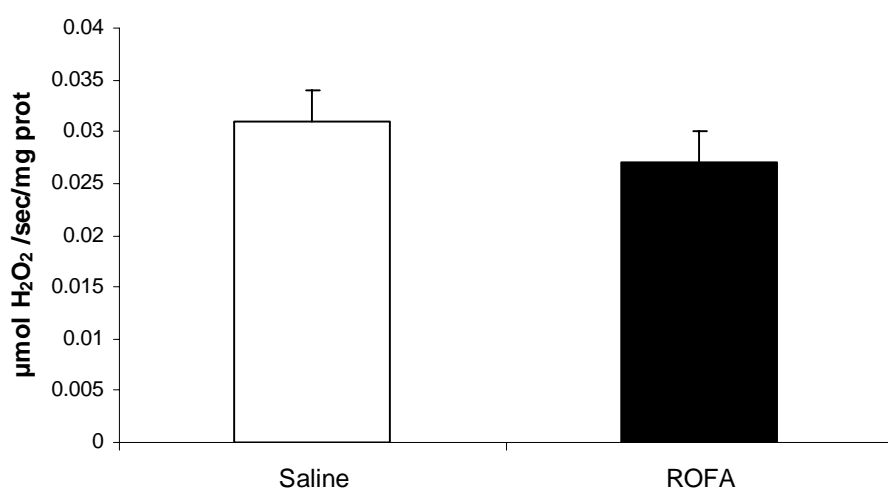


**Figure 1. Malondialdehyde (MDA) concentration in heart of rats treated or not with ROFA and submitted to 20 minutes of swimming exercise session. Values represent the mean of 6 independent determinations per group  $\pm$  standard deviation. Unpaired Student T test, \*  $t=-2.568$ ,  $p=0.03$ .**



**Figure 2. Chemiluminescence in heart of rats treated or not with ROFA and submitted to 20 minutes of swimming exercise session. Values represent the mean of 6 independent determinations per group  $\pm$  standard deviation. Unpaired Student T test, \*  $t=-3.224$ ,  $p=0.015$ .**





**Figure 3.** Catalase activity in heart of rats treated or not with ROFA and submitted to 20 minutes of swimming exercise session. Values represent the mean of 6 independent determinations per group  $\pm$  standard deviation. Unpaired Student T test,  $t=-2.568$ ,  $p=0.087$ .

**Table 1. Diastolic arterial pressure (DAP), systolic arterial pressure (SAP), mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) at rest and during exercise. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Values in parentheses indicate the number of rats per group. Paired Student T test, \* significant differences ( $p < 0.05$ ) between exercise and rest values in the same treatment group.**

Hemodynamic Parameters	Saline Group (n=8)	ROFA Group (n=7)
<b>DAP (mmHg)</b>		
Rest	101.1 $\pm$ 6.2	103.5 $\pm$ 7.8
Exercise	87.9 $\pm$ 8.3*	87.3 $\pm$ 11.3*
delta	-13.2 $\pm$ 8.2	-16.2 $\pm$ 7.5
<b>SAP (mmHg)</b>		
Rest	136.3 $\pm$ 10.4	136.7 $\pm$ 9.8
Exercise	127.3 $\pm$ 9.7*	128 $\pm$ 11*
delta	-9.0 $\pm$ 9.2	-8.7 $\pm$ 3.9
<b>MAP (mmHg)</b>		
Rest	120.7 $\pm$ 6.4	121.7 $\pm$ 6.8
Exercise	109.3 $\pm$ 9.7*	109 $\pm$ 11.4*
delta	-11.4 $\pm$ 8.7	-12.7 $\pm$ 5.8
<b>HR (bpm)</b>		
Rest	370 $\pm$ 38	348 $\pm$ 14
Exercise	432 $\pm$ 15*	416 $\pm$ 36*
delta	61 $\pm$ 43	68 $\pm$ 24

## REFERENCES

AEBI, H. - Catalase in vitro, *Methods in Enzymology*, 105: 121–126, 1984.

BERNIER, M., HEARSE, D.J., MANNING, A.S.- Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen derived free radical. Studies with anti free radical intervention and a free-radical generating in the isolated perfused rat heart. *Circulation Research*, 58: 331-340, 1986.

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*, 72: 248–254, 1976.

BROOK, R.D., FRANKLIN, B., CASCIO, C.W., HONG, Y., HOWARD, G., LIPSETT, M., LUEPKER, R., MITTLEMAN, M., SAMET, J., SMITH, S., TAGER, I. – Air pollution and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from expert panel on population and prevention science of American heart association. *Circulation*, 109: 2655-2671, 2004.

BUEGE, S.A.; AUST, S.D.- Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzimology*, 52:306-10, 1978.

CIDER, A., SVEALV, B.G., TANG, M.S., SCHAUFELBERGER, M., ANDERSSON, B.- Immersion in warm water induces improvement in cardiac function in patients with chronic heart failure. *The European Journal of Heart Failure*, 8: 308-316, 2006.

CRAIG, A.B., DVORAK, M. – Thermal regulation during water immersion. *Journal of Applied Physiology*, 21: 1577-1585, 1966.

DAIGLE C.C.; CHALUPA, D.C.; GIBB, F.R.; MORROW, P.E.; OBERDOSTER, G.; UTELL, M.J.; FRAMPTOM, M.W. – Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. *Inhalation Toxicology* 15(6): 539-52, 2003.

FERREIRA, R., BURGOS, M., LLESUY, S., MOLTENI, L., MILEI, J., FLECHA, B.G., BOVERIS, A. – Reduction of reperfusion injury with mannitol cardioplegia. Effect of supplementing cardioplegic solution with deferoxamine on reperfused human myocardium. *The Annals of Thoracic Surgery*, 48: 77-83, 1989.

FLORIDA-JAMES, G., DONALDSON, K., STONE, V. - Athens 2004: the pollution climate and athletic performance. *Journal of Sports Science*, 22(10):967-80, 2004.

GABRIELSEN, A., JOHANSEN, L.B., NORSK, P. – Central cardiovascular pressure during graded immersion in water at 35°C. *Journal of Applied Physiology*, 75(2): 581-585, 1993.

GABRIELSEN, A., JOHANSEN, L.B., NORSK, P.- Central cardiovascular pressures during graded water immersion in humans. *Journal of Applied Physiology*, 75(2): 581-585, 1993.

GOBBATO, C.A.; MELLO, M.A.; SIBUYA, C.Y.; AZEVEDO, J.R.M.; SANTOS, L.A.; KOKUBUN, E.- Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology, part A*, 130: 21-27, 2001

GONZALEZ-FLECHA, B. – Oxidant mechanisms in response to ambient air particles. – *Molecular Aspects of Medicine*. 25:169-182, 2004.

GRIEVINK, L., JANSEN, S.M., VEER, P.V., BRUNEKREF, B. Acute effects of ozone on pulmonary function of cyclists receiving antioxidant supplements. *Occupational Environmental Medicine*, 55: 13-7, 1998.

GUL, M., DEMIRCAN, B., TAYSI, S., OZTASAN, N., GUMUSTEKIN, K., SIKTAR, E., POLAT, M.F., AKAR, S., AKCAY, F., DANE, S. Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 143(2): 239-45, 2006.

GURGUEIRA, S.A.; LAWRENCE, J.; COULL, B.; MURTHY, G.G. K.; GONZÁLES-FLECHA, B. – Rapid increase in steady-state concentration of reactive oxygen species in lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environmental Health Perspectives*, 110: 749-755, 2002.

KLOT, S.V., PETERS, A., AALTO, P., BELLANDER, T., BERGLIND, N., D'IPPOLITI, D., ELOSUA, R., HORMANN, A., KULMALA, M., LANKI, T., LOWEL, H., PEKKANEN, J., PICCIOTTO, S., SUNYER, J., FORASTIERE, F.; HEALTH EFFECTS OF PARTICLES ON SUSCEPTIBLE SUBPOPULATIONS (HEAPSS) STUDY GROUP. Ambient air pollution is associated with increased risk of hospital cardiac readmissions of myocardial infarction survivors in five European cities. *Circulation*, 112(20): 3073-3079, 2005.

KRAMER, K., DIJKSTRA, H., BAST, A. – Control of physical exercise of rats in a swimming basin. *Physiology and Behavior*, 53: 271-276, 1993.

KRAMER, K., GRIMBERGEN, GRACHT, L.V., IPEREN, D.J., JONKER, R., J., BAST, A. – The use of telemetry to record electrocardiogram and heart rate in freely swimming rats. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 17(2): 107-112, 1995.

KRAUSE, M.S., OLIVEIRA, L.P. JR, SILVEIRA, E.M., VIANNA, D.R., ROSSATO, J.S., ALMEIDA, B.S., RODRIGUES, M.F., FERNANDES, A.J., COSTA, J.A., CURI, R., DE BITTENCOURT, P.I. JR. MRP1/GS-X pump ATPase expression: is this the

explanation for the cytoprotection of the heart against oxidative stress-induced redox imbalance in comparison to skeletal muscle cells? *Cell Biochemistry and Function*, 25(1): 23-32, 2007.

MEDEIROS, N. JR., RIVERO, D.H., KASAHARA, D.I., SAIKI, M., GODLESKI, J.J., KOUTRAKIS, P., CAPELOZZI, V.L., SALDIVA, P.H., ANTONANGELO, L. Acute pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition. *Environmental Research*, 95(1):62-70, 2004.

MENASCHE, P., GRUSSET, C., GAUDUEL, Y., PIWNICA, A. – A comparative study of free radical scavengers in cardioplegic solutions. Improved protection with peroxidase. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 92: 264-271, 1986.

MILLER, K.A., SISCOVIVK, D.S., SHEPPARD, L., SHEPHERD, K., SULLIVAN, J.H., ANDERSON, G.L., KAUFMAN, J.D. – Long term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in woman. *New England Journal of Medicine*, 356(5): 447-58, 2007.

NEMMAR, A., AL-MASKARI, S., ALI, B.H., AL-AMRI, I.S. - Cardiovascular and lung inflammatory effects induced by systemically administered diesel exhaust particles in rats. *American Journal Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 292(3): L664-670, 2007

OKAYAMA, Y., KUWAHARA, M., SUZUKI, A.K., TSUBONE, H. - Role of reactive oxygen species on diesel exhaust particle-induced cytotoxicity in rat cardiac myocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health part A*, 69(18): 1699-1710, 2006.

PARK, K.S., CHOI, J.K., PARK, Y.S.- Cardiovascular regulation during water immersion. *Applied Human Science*, 18(6): 133-241, 1999.

RHODEN, C.R.; LAWRENCE, J.; GODLESKI, J.J.; GONZÁLES-FLECHA, B.- N-acetylcysteine prevents lung inflammation after short-term inhalation exposure to concentrated ambient particles. *Toxicology Sciences* 79(2): 296-303, 2004.

RHODEN, C.R., WELLENIUS, G.A., GHELFI, E., LAWRENCE, J., GONZALEZ-FLECHA, B. - PM-induced cardiac oxidative stress and dysfunction are mediated by autonomic stimulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1725(3):305-313, 2005.

RIVERO, D.H., SOARES, S.R., LORENZI-FILHO, G., SAIKI, M., GODLESKI, J.J., ANTONANGELO, L., DOLHNIKOFF, M., SALDIVA, P.H. - Acute cardiopulmonary alterations induced by fine particulate matter of Sao Paulo, Brazil. *Toxicological Science*, 85(2): 898-905, 2005.

SHARMAN, J.E., COCKCROFT, J.R., COOMBES, J.S. - Cardiovascular implications of exposure to traffic air pollution during exercise. *Quarterly Journal of Medicine*, 97: 637-643, 2004.

SOMANI, S.M., FRANK, S., RYBAK, L.P. – Responses of Antioxidant system to acute and trained exercise in rat heart subcellular fractions. *Pharmacology Biochemistry, and Behavior*, 51(4): 627-634, 1995.

STUREK, M.T., BEDFORD, T.G, TIPTON, C.M., NEWCOMER, L. - Acute cardiorespiratory responses of hypertensive rats to swimming and treadmill exercise. *Journal of Applied Physiology*, 57: 1328-1332, 1984

VOLPINO, P., TOMEI, F., VALLE, C.L., ROSATI, M.V., CIARROCA, M., SIO, S.D., CANGEMI, B., VIGLAROLO, R., FEDELE, F. – Respiratory and cardiovascular function at rest and during exercise testing in a healthy working population: effects of outdoor traffic air pollution. *Occupational Medicine*, 54: 475-482, 2004.

WELLENIUS, G.A., SALDIVA, P.H.N., BATALHA, J.R.F., KRISNA-MURTH, G.G., COULL, B.A., VERRIER, R.L., GODLESKI, J.J. – Exposure to residual oil fly ash (ROFA) particles exacerbates the effects of myocardial infarction in rat. *Toxicological Sciences*, 66: 327-335, 2002.

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. *Circulation Journal*, 70: 129-140, 2006.

YEUNG, P.K., FENG, J.D., FICE, D. - Exercise hemodynamic and neurohormone responses as sensitive biomarkers for diltiazem in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 9(2): 245-251, 2006.

ZANOBETTI, A., CANNER, M.J., STONE, P.H., SCHWARTZ, J., SHER, D., EAGAN-BENGSTON, E., GATES, K.A., HARTLEY, L.H., SUH, H., GOLD, D.R. Ambient pollution and blood pressure in cardiac rehabilitation patients. *Circulation*, 110(15): 2184-2189, 2004.

## 6. CONCLUSÕES

1- A exposição ao MP de uma amostra do ar de Porto Alegre não promoveu alteração do estresse oxidativo pulmonar dos animais; a realização de exercício físico por 60 minutos causou aumento do mesmo independentemente da exposição ao poluente;

2- A instilação intra-traqueal de ROFA, na dose utilizada, promoveu um aumento do estresse pulmonar de ratos. A condição de exercício exacerbou este efeito;

3- A instilação intra-traqueal de ROFA, na dose utilizada, promoveu um aumento do estresse oxidativo cardíaco dos ratos submetidos ao exercício físico;

4- A instilação intra-traqueal de ROFA não promoveu alteração dos parâmetros hemodinâmicos avaliados; o exercício físico causou alteração dos mesmos independentemente da exposição prévia a este poluente.

Em conclusão, nossos resultados demonstram que a exposição ao MP promoveu um aumento do estresse oxidativo cardiopulmonar em ratos exercitados sem causar alterações dos parâmetros hemodinâmicos.