

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ADRIANO SILVA RENNÓ**

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NAS ALTERAÇÕES  
PULMONARES INDUZIDA POR DIFERENTES PRODUTOS DA POLUIÇÃO  
ATMOSFÉRICA**

**São Paulo**

**2016**

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ADRIANO SILVA RENNÓ**

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NAS ALTERAÇÕES  
PULMONARES INDUZIDA POR DIFERENTES PRODUTOS DA POLUIÇÃO  
ATMOSFÉRICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina da Universidade Nove de Julho -  
UNINOVE, como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Mestre em Medicina.

**Orientador: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira**

**São Paulo**

**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Rennó, Adriano Silva.

Efeitos do treinamento físico aeróbio nas alterações pulmonares induzida por diferentes produtos da poluição atmosférica. /

Adriano Silva Rennó. 2016.

39 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2016.

Orientador (a): Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira.

1. Imunologia do exercício. 2. imunologia pulmonar. 3. Poluição do ar. 4. Partículas. 5. Inflamação pulmonar.

I. Vieira, Rodolfo de Paula.

II. Título.

CDU 616

São Paulo, 16 de dezembro de 2016.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno: **Adriano Silva Rennó**

Título da Dissertação: **“Efeitos do treinamento físico aeróbico nas alterações pulmonares induzida por diferentes produtos da poluição atmosférica.”**

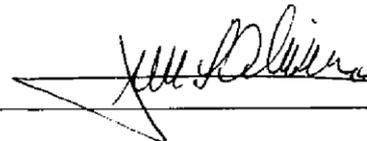
Presidente: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira



Membro: Profa. Dra. Beatriz Manguiera Saraiva Romanholo



Membro: Prof. Dr. Luis Vicente Franco de Oliveira



## DEDICATÓRIA

*Dedico a Deus por essa oportunidade. Ao meu pai que sempre me ensinou o valor aos estudos, minha mãe por ensinar a ser perseverante, aos meus irmãos e familiares por me incentivarem por mais uma conquista mesmo não estando presente.*

*A minha namorada pela paciência e companheirismo.*

*E ao meu amigo e orientador Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira que sempre me estimulou e me deu oportunidades para ampliar meus conhecimentos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço principalmente a Deus por me proporcionar oportunidades e capacidades para realizar esse feito, ao meu orientador Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira pelos ensinamentos passados ao longo deste curso e por ter me orientado com muita paciência.

A Universidade Nove de Julho pela bolsa de Mestrado, a Diretoria de pós-graduação em Medicina, pela oportunidade de ingresso no Mestrado.

Agradeço a todos do laboratório de Imunologia Pulmonar e do Exercício. Aos colegas de curso por estarem sempre ao meu lado nas horas de aperto e nas horas que não sabíamos o que fazer. Amiga parceira Maysa Rangel pela Cia e companheirismo nesse processo de aprendizado

## Resumo

A poluição do ar é um problema crescente em todo o mundo, induzindo e exacerbando várias doenças. Entre os diversos componentes dos poluentes do ar, as partículas (PM), especialmente espessas (10-2,5  $\mu\text{m}$ , PM 10) e finas ( $\leq 2,5 \mu\text{m}$ , PM 2,5), são partículas respiráveis que podem ser facilmente depositadas nos pulmões, Resultando em inflamação pulmonar e sistêmica. Embora a atividade física seja fortemente recomendada, seus efeitos quando praticados em ambientes poluídos são questionáveis. Portanto, o presente estudo avaliou a resposta pulmonar e sistêmica do treinamento concomitante em esteira com exposição de PM

2,5 e PM 10. O treinamento com esteira inibiu o acúmulo de leucócitos totais ( $p < 0,001$ ), neutrófilos ( $p < 0,001$ ), macrófagos ( $p < 0,001$ ) e linfócitos ( $p < 0,001$ ) no lavado broncoalveolar (BAL). Os níveis de BAL de IL-1beta ( $p < 0,001$ ), CXCL1/KC ( $p < 0,001$ ) e TNF-alfa ( $p < 0,001$ ), enquanto os níveis de IL-10 aumentaram ( $p < 0,05$ ).

Efeitos semelhantes foram observados na acumulação de células polimorfonucleares ( $p < 0,001$ ) e mononucleares ( $p < 0,01$ ) no parênquima pulmonar. E no espaço peribrônquico. O treinamento em esteira rolante também inibiu a inflamação sistêmica induzida por PM2,5 e PM10, como observado no número de leucócitos totais ( $p < 0,001$ ) e nos níveis plasmáticos de IL-1beta ( $p < 0,001$ ), CXCL1 / KC ( $p < 0,001$ ) E TNF-alfa ( $p < 0,001$ ), enquanto aumento dos níveis de IL-10 ( $p < 0,001$ ). O treinamento físico aeróbio realizado concomitantemente à exposição ao material particulado PM2.5 e PM10 inibe a inflamação pulmonar e sistêmica induzidas pela exposição à essas partículas.

**Palavras-chave:** imunologia do exercício, imunologia pulmonar, poluição do ar, partículas, inflamação pulmonar.

## **Abstract**

Air pollution is a growing problem worldwide, inducing and exacerbating several diseases. Among the several components of air pollutants, particulate matters (PM), especially thick (10-2,5 $\mu$ m; PM 10) and thin ( $\leq$ 2,5  $\mu$ m; PM 2.5), are breathable particles that easily can be deposited into the lungs, resulting in lung and systemic inflammation. Although physical activity is strongly recommended, its effects when practiced in polluted environments are questionable. Therefore, the present study evaluated the pulmonary and systemic response of concomitant treadmill training with PM 2.5 and PM 10 exposure. Treadmill training inhibited PM 2.5 and PM 10-induced accumulation of total leukocytes ( $p < 0.001$ ), neutrophils ( $p < 0.001$ ), macrophages ( $p < 0.001$ ) and lymphocytes ( $p < 0.001$ ) in bronchoalveolar lavage (BAL), as well as the BAL levels of IL-1 $\beta$  ( $p < 0.001$ ), CXCL1/KC ( $p < 0.001$ ) and TNF- $\alpha$  ( $p < 0.001$ ), while increased IL-10 levels ( $p < 0.05$ ). Similar effects were observed on accumulation of polymorphonuclear ( $p < 0.001$ ) and mononuclear ( $p < 0.01$ ) cells in the lung parenchyma and also in the peribronchial space. Treadmill training also inhibited PM 2.5 and PM 10-induced systemic inflammation, as observed in the number of total leukocytes ( $p < 0.001$ ), and in the plasma levels of IL1 $\beta$  ( $p < 0.001$ ), CXCL1/KC ( $p < 0.001$ ) and TNF- $\alpha$  ( $p < 0.001$ ), while increased IL10 levels ( $p < 0.001$ ). Aerobic treadmill training performed concomitantly to particulate matter exposure, inhibits pulmonary and systemic inflammation induced by exposition to such particles.

**Key words:** exercise immunology, lung immunology, air pollution, particulate matter, lung inflammation.

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	1
1.1 Poluição Atmosférica .....	1
1.2 Material Particulado .....	3
1.3 O Treinamento Físico .....	6
1.3.1 Classificação do Treinamento Físico .....	6
1.3.2 Treinamento Físico Aeróbico .....	7
1.3.3 Treinamento Físico Aeróbico e Sistema Imune .....	7
2. Objetivos .....	9
3. Materiais e Métodos .....	10
3.1. Animais e grupos experimentais .....	10
3.2. Protocolo Experimental .....	10
3.2.1 Instilação do Material Particulado PM2.5 e PM10 .....	10
3.2.2 Treinamento Físico Aeróbio .....	11
3.2.3 Método de Eutanásia .....	12
3.2.4 Coleta e Análise do Lavado Broncoalveolar (LBA) .....	12
3.2.5 Contagem dos Leucócitos Totais Sanguíneos .....	12
3.2.6 Histologia e Análise Morfométrica (quantitativa) da Inflamação nas Vias .....	13
Aéreas e no Parênquima Pulmonar .....	13

3.2.7 Análise dos Níveis de Citocinas Pulmonares e Plasmáticas .....	14
4. Resultados .....	15
5. Discussão.....	34
6. Conclusão .....	36
7. Referencias Bibliográficas.....	37
8. Anexos .....	43
8.1. Anexo I – Aprovação do comitê de ética.....	43
8.2. Anexo II – Artigo submetido para publicação.....	44

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Efeitos do treinamento físico concomitante à exposição do material particulado na capacidade física.....15
- Figura 2-** Efeitos do treinamento físico concomitante à exposição do material particulado sobre o número de células totais no lavado broncoalveolar (LBA) .....16
- Figura 3-** Efeitos do treinamento físico concomitante à exposição do material particulado sobre o número de macrófagos na lavado broncoalveolar (LBA).....17
- Figura 4-** Efeitos do treinamento físico concomitante à exposição do material particulado sobre o número de linfócitos no lavado broncoalveolar (LBA).....18
- Figura 5-** Efeitos do treinamento físico concomitante à exposição do material particulado sobre o número de neutrófilos no lavado broncoalveolar (LBA).....19
- Figura 6-** Efeitos do treinamento físico concomitante à exposição do material particulado sobre o número de IL-1 $\beta$  no lavado broncoalveolar (LBA).....20
- Figura 7-** Efeitos do treinamento físico concomitante à exposição do material particulado sobre o número de IL-1 $\beta$  no sangue.....21
- Figura 8-** Efeitos do treinamento físico concomitante à exposição do material particulado sobre o número de IL-10 no lavado broncoalveolar (LBA).....22
- Figura 9-** Efeitos do treinamento físico concomitante à exposição do material particulado sobre o número de células totais no sangue.....23
- Figura 10-** Efeitos do treinamento físico concomitante à exposição do material particulado sobre o número IL-10 no sangue.....24

<b>Figura 11-</b> Efeitos do treinamento físico concomitante à exposição do material particulado sobre o numero de CXCL-1/KC no lavado broncoalveolar (LBA).....	25
<b>Figura 12-</b> Efeitos do treinamento físico concomitante à exposição do material particulado sobre o numero CXCL-1/KC no sangue.....	26
<b>Figura 13-</b> Efeitos do treinamento físico concomitante à exposição do material particulado sobre o numero TNF- $\alpha$ no lavado broncoalveolar (LBA).....	27
<b>Figura 14-</b> Efeitos do treinamento físico concomitante à exposição do material particulado sobre o numero de TNF- $\alpha$ no sangue.....	28
<b>Figura 15-</b> Efeitos do treinamento físico concomitante à exposição do material particulado sobre o número de células PMN no parênquima.....	29
<b>Figura 16-</b> Efeitos do treinamento físico concomitante à exposição do material particulado sobre o número de células MN no parênquima.....	30
<b>Figura 17-</b> Efeitos do treinamento físico concomitante à exposição do material particulado sobre o número de células PMN peribrônquicas.....	31
<b>Figura 18-</b> Efeitos do treinamento físico concomitante à exposição do material particulado sobre o número de células MN peribrônquicas.....	32
<b>Figura 19</b> Mostra as fotomicrografias representativas de lâminas coradas com hematoxilina e eosina dos grupos Controle, Exe, PM 2,5, PM 10, PM 2,5 + Exe e PM 10 + Exe, com aumento de 400x.....	33

## **1. Introdução**

### **1.1 Poluição Atmosférica**

Segundo a última resolução do conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), entende-se como poluente atmosférico qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em qualidade, concentração, tempo ou características em desacordo com níveis estabelecidos e que torne ou possa tornar o ar: impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde; inconveniente ao bem-estar público, ou danos aos materiais, à fauna e a flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade a às atividades normais da comunidade (CONAMA, 1990)

Assim, a qualidade do ar é uma questão fundamental e cada vez mais preocupante. Muitos estudos têm sido efetuados, sendo baseados nos problemas relacionados com o aumento da poluição atmosférica e seu impacto na saúde. Mesmo com todos os avanços alcançados nas recentes décadas voltados a um ambiente com ar mais limpo, principalmente nos países desenvolvidos, o nível da poluição atmosférica ainda se mantém muito elevado levando uma grande parcela de população humana a sofrer com os danos causados por ela à saúde (Brunekreef e Holgate, 2002; Gouveia et al.,2006; Saldiva, 2008; Dockery, 2009; Sierra-Vargas e Teran, 2012; Swdin 2010). Inúmeros exemplos dos efeitos resultantes da exposição à poluição têm sido descritos, como doenças cardiovasculares, respiratórias e neurológicas (Keuken et al., 2012; Gaffney et al.,2004).

A poluição atmosférica causa impactos além da saúde humana, ela também é causadora de danos na vegetação. Segundo a Agencia Européia do Ambiente, as principais fontes de poluentes são: (I) a queima de combustíveis fósseis na geração de eletricidade, nos transportes, nas indústrias e nos aglomerados domésticos; (II) os

processos industriais e a utilização de solventes; (III) a agricultura; e (IV) o tratamento de resíduos (AEA, 2013).

Com o aumento do crescimento populacional, a expansão urbana, o número de veículos e outras fontes, os impactos causados pela poluição atmosférica na qualidade de vida se tornam mais aparentes (Craig ET AL., 2008). Embora o entendimento dos mecanismos patológicos responsáveis pela relação entre exposição atmosférica e as doenças cardiovasculares e respiratórias não esteja totalmente compreendido (Zereba ET AL.,2001; Brook, 2008; Shrey et al, 2011), estudos experimentais, clínicos e epidemiológicos indicam que a exposição ao material particulado (um dos principais componentes da poluição do ar) é capaz de provocar disfunções do sistema nervoso autônomo (Pope III ET al., 2004; Rivero ET al., 2005; Adar et al., 2007; Burgan ET al., 2010; Jia ET al.,2012), remodelamento ventricular (Word ET al., 2012) e processos inflamatórios sistêmicos comprometendo o sistema cardiovascular (Feng e Yang, 2012; Grahane e Schlesinger, 2012; Langrish ET al., 2012).

A poluição atmosférica é composta pela combinação de partículas sólidas com diferentes diâmetros e gases tóxicos à saúde humana. Os poluentes mais comumente encontrados na atmosfera são o material particulado (MP) e os materiais gasosos: ozônio ( $O_3$ ), dióxido de enxofre ( $SO_2$ ), monóxido de carbono (CO) e óxidos de nitrogênio ( $NO_x$ ) (Organização Mundial de Saúde – OMS. 2005)

## 1.2. Material Particulado

Material particulado é o nome usado para descrever uma complexa mistura de partículas sólidas e líquidas em suspensão no ar, de origem natural ou antropogênica. O tamanho, a composição química, e outras propriedades físicas e biológicas dependem da fonte e das transformações atmosféricas sofridas pelas partículas. A descrição mais comumente utilizada para caracterizar o material particulado quanto ao tamanho é o diâmetro aerodinâmico, definido como diâmetro de uma esfera densa que tem a mesma velocidade de sedimentação da partícula em questão (DOCRERY; POPE, 1994). O diâmetro pode variar entre 0,002  $\mu\text{m}$  e 100  $\mu\text{m}$ . As partículas grandes com Diâmetro acima de 100  $\mu\text{m}$  não permanecem por muito tempo em suspensão e tendem a se precipitar rapidamente. As gotas de chuva são um exemplo. As partículas de maior importância para os aspectos físicoquímicos da atmosfera e para a saúde humana são as de diâmetro compreendido entre 0,002 a 10  $\mu\text{m}$ . Com base no seu diâmetro as partículas são classificadas em três classes:

- a) Ultrafina ou núcleo de Aitken: partículas de diâmetro menor que 0,1  $\mu\text{m}$
- b) Fina ou de acumulação: partículas com diâmetro entre 0,1 e 2,5  $\mu\text{m}$
- c) Grandes ou grossas (coarse mode): partículas com diâmetro maior que 2,5  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$ .

As partículas de maior tamanho são normalmente produzidas por processo mecânico como vento ou erosão. Como característica, elas são grossas e assim são retiradas da atmosfera por sedimentação, exceto em dias de vento quando a sedimentação é balanceada pela reentrada dessas partículas na atmosfera. Elas também podem ser removidas pela chuva. Sob o ponto de vista químico, a composição das partículas reflete a fonte de origem, com predominância de

compostos inorgânicos para as derivadas do solo e da névoa marinha. São também encontradas partículas biológicas com predominância de compostos orgânicos como pólen, esporos, fragmentos de plantas, insetos, etc.

Partículas finas e ultrafinas são preferencialmente emitidas por processos de combustão. Geralmente as partículas finas e ultrafinas são compostas por material carbonáceo, metais, compostos orgânicos e íons sulfatos, nitratos e amoníacos. As partículas ultrafinas tendem a se agrupar por aglomeração ou por condensação, aumentando o diâmetro aerodinâmico e transformando-se em partículas finas ("USEPA", 1996).

Partículas maiores que 10  $\mu\text{m}$  são retidas no nariz e nasofaringe, e eliminadas pela deglutição, tosse, espirros e pelo aparelho mucociliar. Partículas menores de 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro ( $\text{PM}^{10}$ ) ficam retidas nas vias aéreas superiores e podem ser depositadas na árvore traqueobrônquica. Partículas menores que 2,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro ( $\text{PM}^{2.5}$ ) depositam no bronquíolo terminal. Nos alvéolos ocorre deposição de partículas bem menores, com 1 a 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro. As partículas que atingem as porções mais distais das vias respiratórias são fagocitadas pelos macrófagos alveolares, sendo posteriormente removidas pelo aparelho mucociliar ou pelo sistema linfático (BASCUM et al., 1996; WHO, 1999).

Não está totalmente explicado o mecanismo pelo qual o material particulado produz lesões teciduais no sistema respiratório. Estudos utilizando animais de laboratório mostraram que partículas que apresentam citotoxicidade *in vitro* também diminuíram as defesas contra as infecções (HATCH et al., 1985) O  $\text{PM}^{10}$  pode, *in vitro*, induzir a síntese de interleucina 6, interleucina 8, e fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) em células de epitélio respiratório humano. Este fato é dependente da concentração

de metais (cádmio, cobre, zinco entre outros) no material particulado (CARTER et al., 1997). Além disso, alguns estudos que avaliaram o lavado broncoalveolar de animais submetidos à exposição do material particulado, revelaram aumento de celularidade (neutrófilos e eosinófilos) e aumento de produção de interleucinas 4 e 5 (WALTERS et al., 1999), demonstrando um efeito pró-inflamatório da exposição a esse tipo de material.

De maneira geral, diversos estudos epidemiológicos associam os efeitos adversos do material particulado à doença pulmonar inflamatória prévia. Além disso, outros estudos sugerem um papel importante dessa inflamação prévia também na exacerbação de doenças pulmonares e salientam a importância da presença de neutrófilos na agudização da doença crônica de vias aéreas (MULLEN et al., 1985; THOMPSON et al., 1989), como resultado à exposição ao material particulado.

Esse efeito pró-inflamatório da exposição ao material particulado é particularmente importante, uma vez que diversos estudos mostram a correlação entre o aumento de neutrófilos e o aumento da responsividade das vias aéreas na asma (HUTSON et al., 1990; PAUWELS et al., 1990). A presença de inflamação pulmonar é um campo propício para início da avaliação dos mecanismos que associa morbidade e mortalidade com inalação de partículas. SHI et al. (1996) sugerem que os efeitos da poluição do material particulado à saúde, podem ser parte de uma resposta inicial e que agiriam como um fator estimulante da inflamação. Esse efeito pode ser verificado não somente no contexto das doenças respiratórias, mas também das doenças cardiovasculares, uma vez que cães expostos ao material particulado fino apresentaram alterações eletrocardiográficas mostrando que o material particulado pode induzir alterações cardíacas, além de alterações respiratórias (GODLESK,

1997). Assim, podemos afirmar que estudos epidemiológicos já comprovaram a relação entre material particulado e agravos à saúde na população urbana.

### **1.3 O Treinamento Físico**

Os benefícios proporcionados pelo treinamento físico à população, em geral, são bem conhecidos, e são de natureza física, mental, emocional e psicossocial. O exercício regular melhora o humor, diminui a ansiedade e a depressão, auxilia no controle do estresse e do peso corporal, diminui os fatores de risco cardiovasculares, mantém saudáveis ossos, músculos e articulações (Knap, et al., 2005)

#### **1.3.1 Classificação do Treinamento Físico**

O treinamento físico pode ser classificado em relação ao sistema específico de transferência de energia predominante ativo. A classificação de atividade em aeróbica e anaeróbica é baseada na intensidade, duração e via energética para obtenção de energia, enquanto atividades de baixa intensidade e longa duração utilizam a via aeróbia. Dessa forma o treinamento, tanto aeróbico quanto anaeróbico, gera adaptações metabólicas e fisiológicas específicas que consistem em alterações celulares e fisiológicas (McArdle, 1996).

### **1.3.2 Treinamento Físico Aeróbico**

O treinamento físico aeróbico é o tipo de exercício físico que produz maior benefícios cardiovasculares (ACSM, 2000). É considerado exercício aeróbico quando a maior parte da demanda de energia é suprida do metabolismo aeróbio (Kutner, 2007., Johansen, 2007). Esses exercícios são caracterizados por atividades realizadas com movimentos cíclicos, envolvendo grandes grupos musculares, com intensidade leve a moderada (50% a 80% do VO<sub>2</sub> máx.) e com duração longa (20 a 60 minutos). O treinamento físico aeróbico realizado de maneira sistemática e regular desencadeia uma série de adaptações crônicas benéficas em todo o organismo, tais como: redução da pressão e da frequência cardíaca de repouso em indivíduos hipertensos (Pechter, et al., 2003, Kohziki, et al, 2001), aumento do consumo máximo de oxigênio (Kutner, 2007., Johansen, 2007)., aumento da massa muscular e densidade óssea (Kutner, 2007), melhora da resposta imunológica (se a atividade for predominantemente realizada em intensidade leve ou moderada) (Miller, et al., 2002) e aumento da expressão e atividade antioxidante (Boyce, et al., 1997. Mansur, 2007)). Tanto sua prática aguda (uma única sessão) quanto crônica (treinamento crônico, regular e estruturado) produz efeitos cardiovasculares benéficos.

### **1.3.3 Treinamento Físico Aeróbico e Sistema Imune**

Os efeitos antiinflamatórios do treinamento físico aeróbico têm sido extensivamente investigado (Pertersen, 2005). De maneira geral, há um consenso na literatura de que o treinamento físico aeróbico de alta intensidade e longa duração desencadeiam uma resposta pró-inflamatória enquanto as atividades de intensidades leve e moderada e média ou longa duração desencadeiam uma resposta antiinflamatória (Pertersen, 2005. Zieker, et al., 2005). O treinamento físico modula a

resposta inflamatória inata e adquirida (Petersen e Pedersen 2005; Vieira et al., 2007; Vieira et al., 2008a). Os fatores que determinam as respostas ao treinamento físico são a intensidade, a duração e o tipo de exercício (Petersen e Pedersen 2005; Vieira et al., 2007; Vieira et al., 2008a). De maneira geral, os efeitos protetores do treinamento físico aeróbio são mediados via interação dos sistemas imunológico e neuroendócrino, através de sinais moleculares na forma de hormônios, citocinas e neurotransmissores (Petersen e Pedersen, 2005).

O treinamento físico aeróbio de intensidade leve e moderada, realizado de maneira regular apresenta inúmeros benefícios à saúde, tanto de caráter profilático quanto terapêutico frente a inúmeras doenças, como lesão pulmonar aguda, asma, diabetes tipo II, aterosclerose e doenças cardíacas (Jolliffe et al., 2000; Boule et al., 2001; Laçasse et al., 2002; Petersen e Pedersen, 2005; Vieira et al., 2007; Vieira et al., 2008a; Mussi et al., 2008).

Diversos estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o treinamento físico aeróbio apresenta efeitos benéficos em indivíduos ou animais com alterações do sistema respiratório, como na Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA)/Lesão Pulmonar Aguda (LPA) (Mussi et al., 2008), na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (Elçi et al., 2008), na Asma (Vieira et al., 2007; Vieira et al., 2008a) e na Fibrose Cística (Gruber et al., 2008; Trooster et al., 2008).

Por outro lado, as informações disponíveis sobre os pulmões de praticantes de atividade física expostos diariamente aos produtos da poluição atmosférica são escassas. Oliveira et al., 2006 demonstraram que mulheres saudáveis do corpo de bombeiros expostas agudamente à poluição apresentaram desempenho diminuído em exercícios sub-máximos. Wong et al., 2007 demonstraram que a prática regular

de exercícios foi capaz de inibir a prevalência de morte pré-matura associada aos efeitos da poluição. Rundell e Caviston (2008) demonstraram que, em indivíduos saudáveis, a *performance* foi diminuída após 3 dias de exposição ao material particulado PM1, mas não após 1 dia de exposição. Os autores atribuíram esses efeitos do PM1, a dois fatores: a) acúmulo do PM1 ao longo dos dias nos pulmões, resultando num efeito direto nos pulmões; b) alterações da microcirculação pulmonar. Entretanto, nenhum desses estudos avaliou o efeito direto dos constituintes da poluição sobre parâmetros inflamatórios e de remodelamento pulmonar, nem sobre a mecânica ou hiperresponsividade pulmonar.

## **2. Objetivos**

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de 5 semanas do treinamento físico aeróbio de intensidade leve, realizado concomitantemente à inalação do material particulado (PM 2,5 e PM 10), 5 dias/semana por 5 semanas sobre a inflamação pulmonar e sistêmica de camundongos C57Bl/6.

Como parte dos possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos deletérios dos produtos da poluição sobre os pulmões, assim como nos possíveis efeitos protetores do treinamento físico aeróbio, foram avaliados os seguintes parâmetros:

- 1- O número de células mononucleares e polimorfonucleares nas vias aéreas e no parênquima pulmonar.

- 2- O número de células totais e diferenciais no lavado broncoalveolar.

3- O número de leucócitos totais no sangue.

4- Os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias no sobrenadante do lavado broncoalveolar e no plasma.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Animais e grupos experimentais**

Setenta e dois camundongos C57Bl/6 machos, adultos jovens, com peso entre 18-25 gramas, provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina da USP, foram distribuídos em 6 grupos experimentais, como se segue: (1) Controle (Control), (2) Exercício (Exe), (3) PM2.5 (PM2.5), (4) PM10 (PM10), (5) PM2.5+Exercício (PM2.5+Ex), (6) PM10+Exercício (PM10+Ex).

#### **3.2. Protocolo Experimental**

##### **3.2.1. Instilação do Material Particulado PM2.5 e PM10**

O material particulado PM2.5 e PM10 contidos em filtros de policarbonato foram coletados e separados de acordo com o tamanho das partículas através de coletador gravimétrico e foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LIM 5), da Faculdade de Medicina da USP, sob responsabilidade da Profa. Dra. Thaís Mauad. Os animais dos grupos PM2.5, PM10, PM2.5+Ex e PM10+Ex receberam 10µL de suspensão de MP2,5 (1mg/ml) ou MP10 (1mg/ml) por via intranasal (i.n) e os grupos Controle e Exe receberam 10 µL de solução de salina 0,9%. O procedimento de instilação será realizado 5 vezes por semana durante 5 semanas com o auxílio de micropipeta. Para os animais dos grupos PM2.5 e PM10, a instilação do PM foi realizada após a realização de 10 minutos do

exercício em esteira, sendo que os animais eram colocados de volta na esteira imediatamente após a instilação do material particulado, para completarem o protocolo de exercício de 60 minutos. A instilação provoca um reflexo de apnéia seguida por uma inspiração profunda que impulsiona o líquido para os pulmões dos animais.

### **3.2.2. Treinamento Físico Aeróbio**

O treinamento físico aeróbio foi realizado em esteira ergométrica adaptada para camundongos (modelo Super ATL, marca Imbramed®, RS, Brasil), por um período de 05 semanas (Vieira et al 2007; Vieira et al 2008, Vieira et al 2009; Vieira et al 2011; Vieira et al 2012). Na semana anterior ao período de treinamento, os animais foram submetidos a 03 dias de adaptação na esteira ergométrica que constou de 10 minutos a uma velocidade de 0,2 Km/h. Vinte e quatro horas após o terceiro dia de adaptação, os animais foram submetidos a um teste de esforço máximo. O teste consistiu de 05 minutos de aquecimento a uma velocidade de 0,2 Km/h que foi aumentada em 0,1 Km/h a cada 2,5 minutos até a exaustão dos animais. Os animais foram considerados exaustos quando não conseguiram permanecer correndo mesmo após 10 estímulos mecânicos (Vieira et al 2007; Vieira et al 2008, Vieira et al 2009; Vieira et al 2011; Vieira et al 2012). A intensidade do treinamento que foi utilizada foi a intensidade leve, que correspondeu a 50% da velocidade máxima alcançada no teste físico. O treinamento foi realizado 05 vezes por semana, 60 minutos por sessão, durante 05 semanas. Após este período, o teste físico foi repetido com o intuito de reavaliar o condicionamento físico dos animais.

### **3.2.3. Método de Eutanásia**

Vinte e quatro horas após o último teste físico e após a última instilação de PM2.5, PM10 ou NaCl 0,9%, os animais foram anestesiados com quetamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) por via intra-peritoneal, seguido da coleta sanguínea (1ml) via aorta abdominal, seguido de exanguinação via aorta abdominal para eutanásia.

### **3.2.4. Coleta e Análise do Lavado Broncoalveolar (LBA)**

Após a coleta de sangue, foi realizada a traqueostomia, com inserção de uma cânula de 18 gauge, acoplada à uma seringa de 1ml com o intuito de colher o lavado broncoalveolar (LBA). O lavado LBA foi realizado através da lavagem dos pulmões internamente com 1,5ml de solução salina (0,9%). Este volume foi cuidadosamente injetado dividido em três vezes de 0,5ml. Foi recuperado 1,0ml, o qual foi imediatamente centrifugado a 4°C, 900g, durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado à -70°C para a dosagem das citocinas pelo método de ELISA. O botão de células foi ressuspensionado em 1,0ml de salina e foi imediatamente utilizado para contagem total no número de células no hematocítômetro (câmara de Neubauer). Do volume de 1,0ml ressuspensionado, 0,03ml foi utilizado para a preparação de lâminas para a contagem diferencial em citocentrífuga. As lâminas foram coradas com corante hematológico Diff-Quick e foram contadas 300 células por lâmina.

### **3.2.5. Contagem dos Leucócitos Totais Sanguíneos**

Imediatamente após a coleta de sangue, 0,01ml de sangue foi diluído no corante azul de tripan e a contagem dos leucócitos totais no sangue foi realizada utilizando-se um hematocítômetro (câmara de Neubauer).

### **3.2.6. Histologia e Análise Morfométrica (quantitativa) da Inflamação nas Vias Aéreas e no Parênquima Pulmonar**

Após a coleta do sangue e do LBA, a caixa torácica foi aberta cuidadosamente e o conjunto coração e pulmões foi removido em bloco e o coração separado dos pulmões. Os pulmões foram então perfundidos com 1ml de formol 10%, submerso em formol 10% e submetidos à rotina histológica. Após emblocamento, foram realizados cortes histológicos de 5µm, os quais foram corados com hematoxilina e eosina.

Para a análise quantitativa do número de células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) no espaço peribrônquico e no parênquima pulmonar, foram utilizados os seguintes métodos:

Inflamação peribrônquica: Para cada animal foram avaliadas 5 vias aéreas por animal analisadas num aumento de 400x. Foi utilizado um microscópio Olympus BX43 acoplado a uma câmara fotográfica colorida Olympus Qcolor3. O software de análise de imagem (Image Pro-Plus 4.1, Media Cybernetics, Silver Spring, Md., USA) foi utilizado para a medida do espaço peribrônquico e a contagem do número de células MN e PMN dentro desse espaço foi realizada de acordo com as características e critérios histo-hematológicos. Dessa forma, o número de células MN e PMN por mm<sup>2</sup> de área peribrônquica foi avaliado (Vieira et al 2007).

Inflamação no parênquima pulmonar: Para cada animal foram avaliados 15 campos aleatórios do parênquima pulmonar por animal, os quais foram analisados num aumento de 400x. Foi utilizado um microscópio Olympus BX43 acoplado a uma câmara fotográfica colorida Olympus Qcolor3. O software de análise de imagem (Image Pro-Plus 4.1, Media Cybernetics, Silver Spring, Md., USA) foi utilizado para a medida da área de tecido do parênquima, e a contagem do número de células MN e

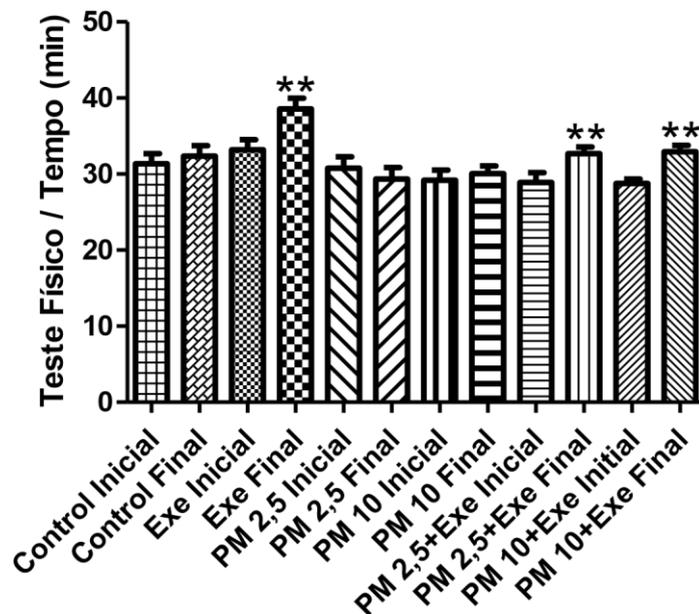
PMN dentro desse espaço foi realizada de acordo com as características e critérios histo-hematológicos. Dessa forma, o número de células MN e PMN por mm<sup>2</sup> de área de parênquima foi avaliado (Vieira et al 2008).

### **3.2.7. Análise dos Níveis de Citocinas Pulmonares e Plasmáticas**

Os níveis das citocinas IL-1beta, CXCL1, TNF-alfa e IL-10 foram avaliadas no sobrenadante do LBA e no plasma pelo método de ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, CA, EUA).

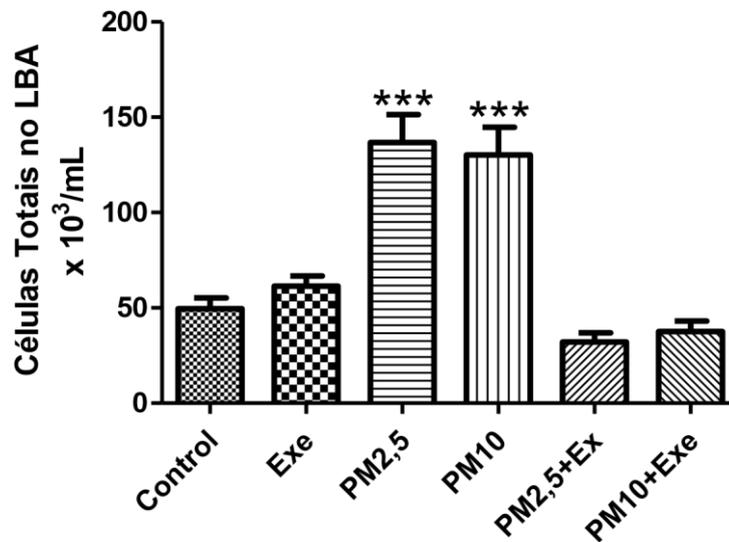
#### 4. Resultados

A figura 1 apresenta os efeitos do treinamento físico realizado concomitantemente à exposição do material particulado sobre a capacidade de exercício em esteira ergométrica. O teste foi realizado após adaptação na esteira e antes da exposição ao material particulado, e após as cinco semanas de treinamento físico concomitantes à exposição ao material particulado PM 2.5 e PM 10. Os resultados demonstraram que tanto os animais não expostos ao material particulado (grupo Exe;  $p < 0.05$ ), quanto os animais exercitados e expostos ao material particulado (PM 2.5+Exe;  $p < 0.05$  e PM 10+Exe;  $p < 0.05$ ) apresentaram melhora da capacidade de exercício, conforme evidenciado pelo aumento do tempo de exercício durante o teste físico.



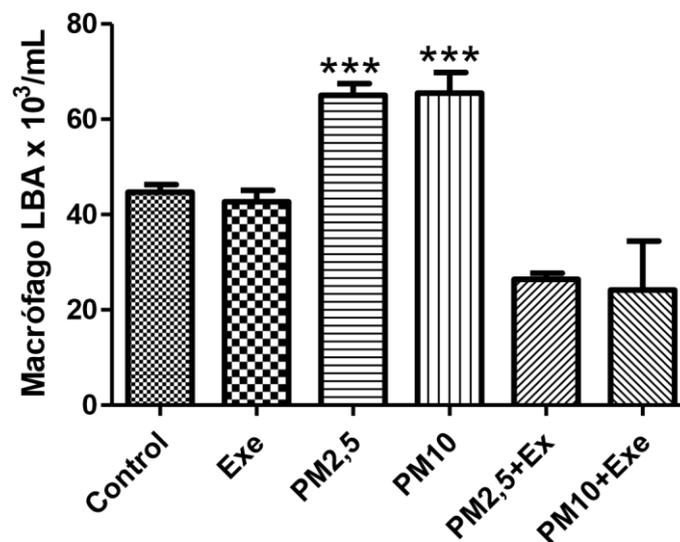
**Figura 1.** \* $p < 0.05$  comparado aos grupos com denominação inicial.

A figura 2 apresenta os efeitos do treinamento físico realizado concomitantemente à exposição do material particulado sobre o número de células totais no lavado broncoalveolar (LBA). Os resultados demonstraram que a exposição tanto ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) quanto PM 10 ( $p < 0.001$ ) resultaram num aumento do acúmulo de células totais no lavado broncoalveolar, quando comparado a todos os demais grupos. Além disso, a figura 2 também demonstra que o treinamento físico aeróbio de intensidade leve, realizado concomitantemente à exposição ao material particulado, foi capaz de inibir completamente esse acúmulo, seja para os animais expostos ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) ou ao material particulado PM 10 ( $p < 0.001$ ).



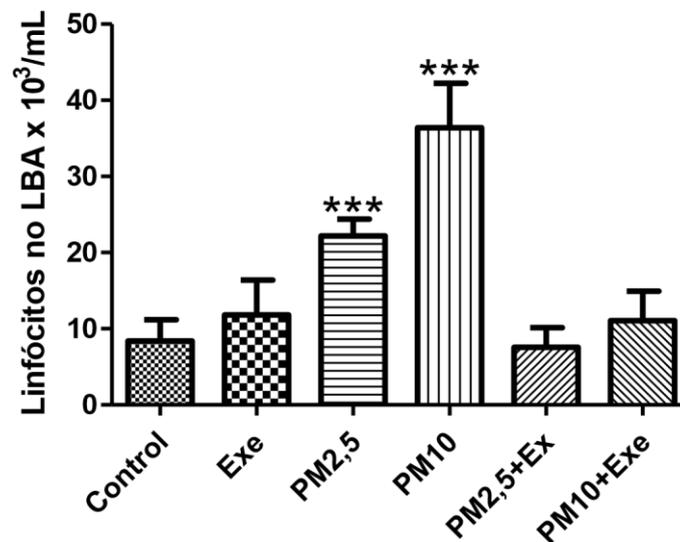
**Figura 2.** \*\*\* $p < 0.001$  comparado a todos os demais grupos.

A figura 3 apresenta os efeitos do treinamento físico realizado concomitantemente à exposição do material particulado sobre o número de macrófagos no lavado broncoalveolar (LBA). Os resultados demonstraram que a exposição tanto ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) quanto PM 10 ( $p < 0.001$ ) resultaram num aumento do acúmulo de macrófagos no lavado broncoalveolar, quando comparado a todos os demais grupos. Além disso, a figura 3 também demonstra que o treinamento físico aeróbio de intensidade leve, realizado concomitantemente à exposição ao material particulado, foi capaz de inibir completamente esse acúmulo, seja para os animais expostos ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) ou ao material particulado PM 10 ( $p < 0.001$ ).



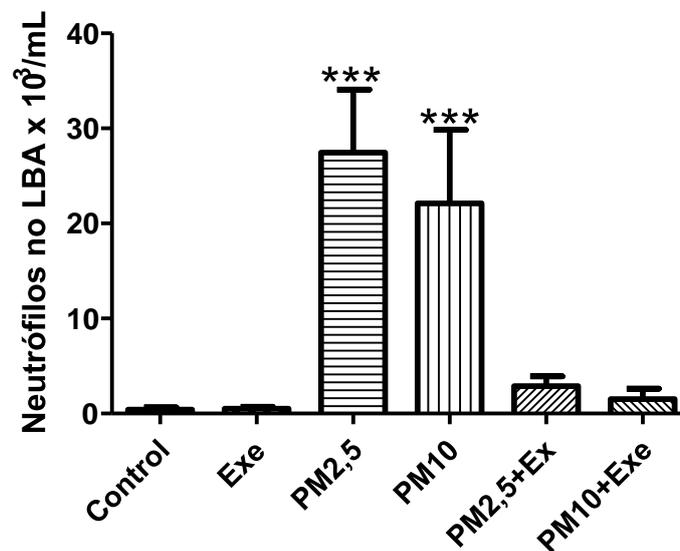
**Figura 3.** \*\*\* $p < 0.001$  comparado a todos os demais grupos.

A figura 4 apresenta os efeitos do treinamento físico realizado concomitantemente à exposição do material particulado sobre o número de linfócitos no lavado broncoalveolar (LBA). Os resultados demonstraram que a exposição tanto ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) quanto PM 10 ( $p < 0.001$ ) resultaram num aumento do acúmulo de linfócitos no lavado broncoalveolar, quando comparado a todos os demais grupos. Além disso, a figura 4 também demonstra que o treinamento físico aeróbio de intensidade leve, realizado concomitantemente à exposição ao material particulado, foi capaz de inibir completamente esse acúmulo, seja para os animais expostos ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) ou ao material particulado PM 10 ( $p < 0.001$ ).



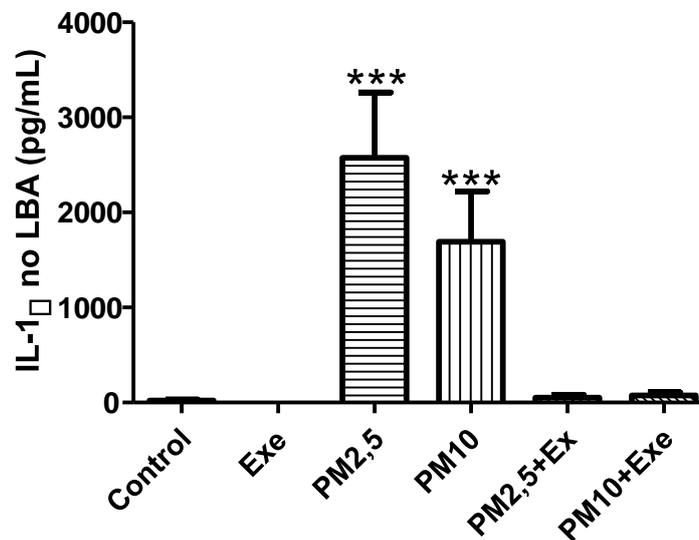
**Figura 4.** \*\*\* $p < 0.001$  comparado a todos os demais grupos.

A figura 5 apresenta os efeitos do treinamento físico realizado concomitantemente à exposição do material particulado sobre o número de neutrófilos no lavado broncoalveolar (LBA). Os resultados demonstraram que a exposição tanto ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) quanto PM 10 ( $p < 0.001$ ) resultaram num aumento do acúmulo de neutrófilos no lavado broncoalveolar, quando comparado a todos os demais grupos. Além disso, a figura 5 também demonstra que o treinamento físico aeróbico de intensidade leve, realizado concomitantemente à exposição ao material particulado, foi capaz de inibir completamente esse acúmulo, seja para os animais expostos ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) ou ao material particulado PM 10 ( $p < 0.001$ ).



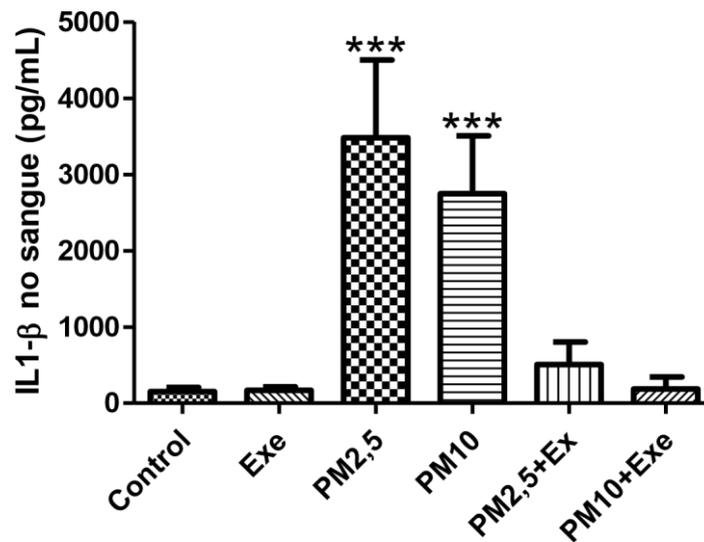
**Figura 5.** \*\*\* $p < 0.001$  comparado a todos os demais grupos.

A figura 6 apresenta os efeitos do treinamento físico realizado concomitantemente à exposição do material particulado sobre o número de IL-1 $\beta$  no lavado broncoalveolar (LBA). Os resultados demonstraram que a exposição tanto ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) quanto PM 10 ( $p < 0.001$ ) resultaram num aumento do acúmulo de IL-1 $\beta$  no lavado broncoalveolar, quando comparado a todos os demais grupos. Além disso, a figura 6 também demonstra que o treinamento físico aeróbico de intensidade leve, realizado concomitantemente à exposição ao material particulado, foi capaz de inibir completamente esse acúmulo, seja para os animais expostos ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) ou ao material particulado PM 10 ( $p < 0.001$ ).



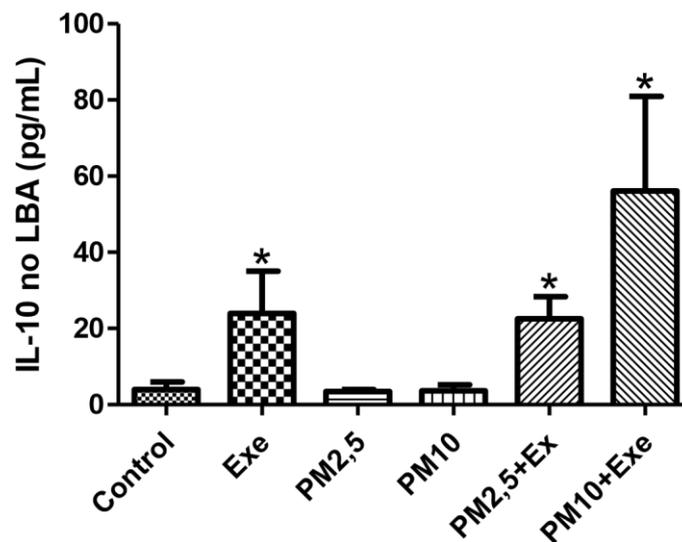
**Figura 6.** \*\*\* $p < 0.001$  comparado a todos os demais grupos.

A figura 7 apresenta os efeitos do treinamento físico realizado concomitantemente à exposição do material particulado sobre o número de IL-1 $\beta$  no sangue. Os resultados demonstraram que a exposição tanto ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) quanto PM 10 ( $p < 0.001$ ) resultaram num aumento do acúmulo de IL-1 $\beta$  no sangue, quando comparado a todos os demais grupos. Além disso, a figura 7 também demonstra que o treinamento físico aeróbico de intensidade leve, realizado concomitantemente à exposição ao material particulado, foi capaz de inibir completamente esse acúmulo, seja para os animais expostos ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) ou ao material particulado PM 10 ( $p < 0.001$ ).



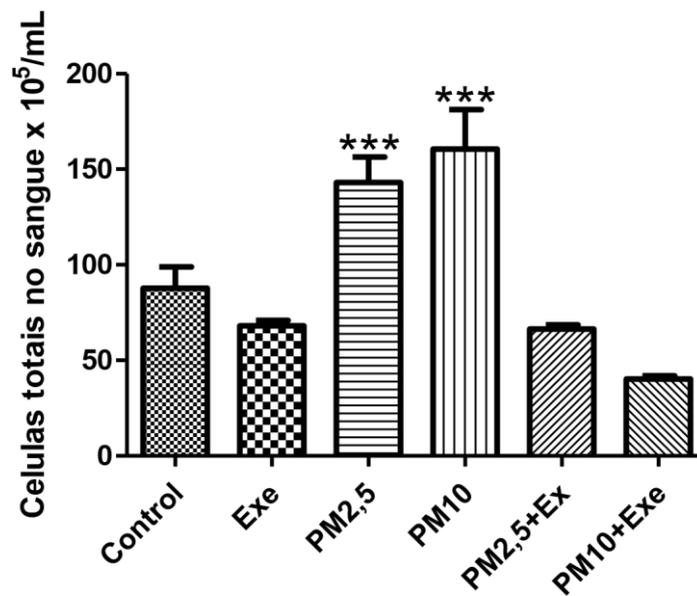
**Figura 7.** \*\*\* $p < 0.001$  comparado a todos os demais grupos.

A figura 8 apresenta os efeitos do treinamento físico realizado concomitantemente à exposição do material particulado sobre o número de IL-10 no lavado broncoalveolar (LBA). Os resultados demonstraram que tanto os animais não expostos ao material particulado (grupo Exe;  $p < 0.05$ ), quanto os animais exercitados e expostos ao material particulado (PM 2.5+Exe;  $p < 0.05$  e PM 10+Exe;  $p < 0.05$ ). Resultaram num aumento do acúmulo de IL10 no lavado broncoalveolar (LBA), quando comparado a todos os demais grupos. Além disso, a figura 8 também demonstra que o treinamento físico aeróbico de intensidade leve, realizado concomitantemente à exposição ao material particulado, foi capaz de aumentar esse acúmulo, seja para os animais não expostos ao material particulado (grupo Exe;  $p < 0.05$ ), quanto os animais exercitados e expostos ao material particulado (PM 2.5+Exe;  $p < 0.05$  e PM 10+Exe;  $p < 0.05$ ).



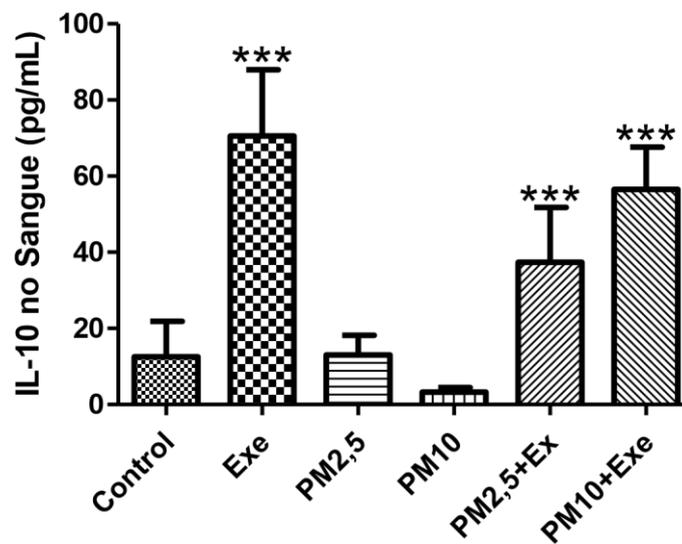
**Figura 8.** \* $p < 0.05$  comparado a todos os demais grupos.

A figura 9 apresenta os efeitos do treinamento físico realizado concomitantemente à exposição do material particulado sobre o número de células totais no sangue. Os resultados demonstraram que a exposição tanto ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) quanto PM 10 ( $p < 0.001$ ) resultaram num aumento do acúmulo de células totais no sangue quando comparado a todos os demais grupos. Além disso, a figura 9 também demonstra que o treinamento físico aeróbio de intensidade leve, realizado concomitantemente à exposição ao material particulado, foi capaz de inibir completamente esse acúmulo, seja para os animais expostos ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) ou ao material particulado PM 10 ( $p < 0.001$ ).



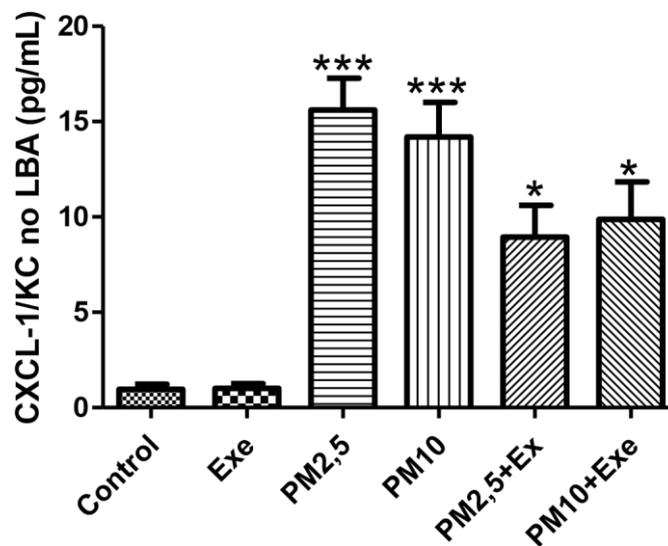
**Figura 9.** \*\*\* $p < 0.001$  comparado a todos os demais grupos.

A figura 10 apresenta os efeitos do treinamento físico realizado concomitantemente à exposição do material particulado sobre o número de IL-10 no sangue. Os resultados demonstraram que tanto os animais não expostos ao material particulado (grupo Exe;  $p < 0.05$ ), quanto os animais exercitados e expostos ao material particulado (PM 2.5+Exe;  $p < 0.05$  e PM 10+Exe;  $p < 0.05$ ). Resultaram num aumento do acúmulo de IL-10 no sangue, quando comparado a todos os demais grupos. Além disso, a figura 10 também demonstra que o treinamento físico aeróbico de intensidade leve, realizado concomitantemente à exposição ao material particulado, foi capaz de aumentar esse acúmulo, seja para os animais não expostos ao material particulado (grupo Exe;  $p < 0.001$ ), quanto os animais exercitados e expostos ao material particulado (PM 2.5+Exe;  $p < 0.001$  e PM 10+Exe;  $p < 0.001$ ).



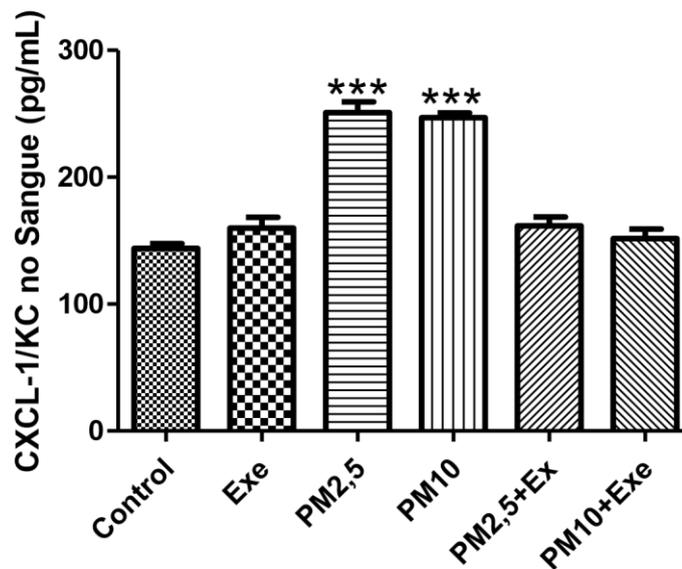
**Figura 10.** \*\*\* $p < 0.001$  comparado a todos os demais grupos.

A figura 11 apresenta os efeitos do treinamento físico realizado concomitantemente à exposição do material particulado sobre o número de CXCL-1/KC no lavado broncoalveolar (LBA). Os resultados demonstraram que a exposição tanto ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) quanto PM 10 ( $p < 0.001$ ) e nos animais exercitados e expostos ao material particulado (PM 2.5+Exe;  $p < 0.05$  e PM 10+Exe; –  $p < 0.05$ ). resultaram num aumento do acúmulo de CXCL-1/KC no lavado broncoalveolar (LBA) e nos animais quando comparado a todos os demais grupos. Além disso, a figura 11 também demonstra que o treinamento físico aeróbio de intensidade leve, realizado concomitantemente à exposição ao material particulado, foi capaz de inibir parcialmente esse acúmulo, seja para animais exercitados e expostos ao material particulado (PM 2.5+Exe;  $p < 0.05$  e PM 10+Exe; –  $p < 0.05$ ).



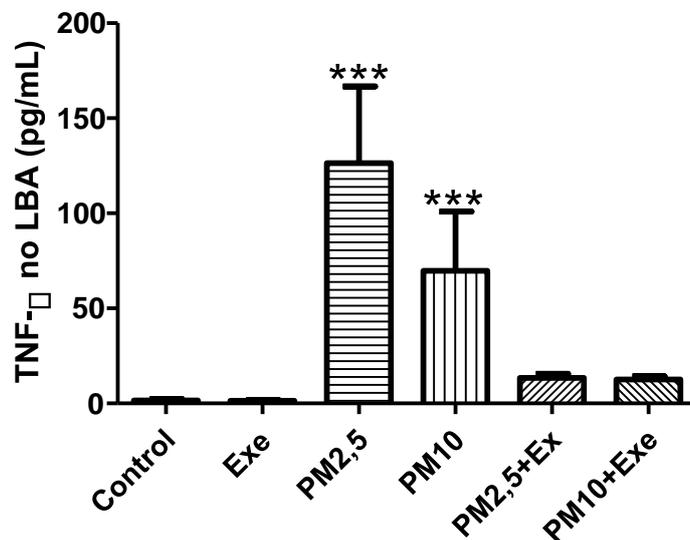
**Figura 11.** \*\*\* $p < 0.001$  comparado a todos os demais grupos,  $p < 0.05$  comparado a todos os demais grupos.

A figura 12 apresenta os efeitos do treinamento físico realizado concomitantemente à exposição do material particulado sobre o número de CXCL-1/KC no sangue. Os resultados demonstraram que a exposição tanto ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) quanto PM 10 ( $p < 0.001$ ) resultaram num aumento do acúmulo de células totais no sangue quando comparado a todos os demais grupos. Além disso, a figura 12 também demonstra que o treinamento físico aeróbio de intensidade leve, realizado concomitantemente à exposição ao material particulado, foi capaz de inibir completamente esse acúmulo, seja para os animais expostos ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) ou ao material particulado PM 10 ( $p < 0.001$ ).



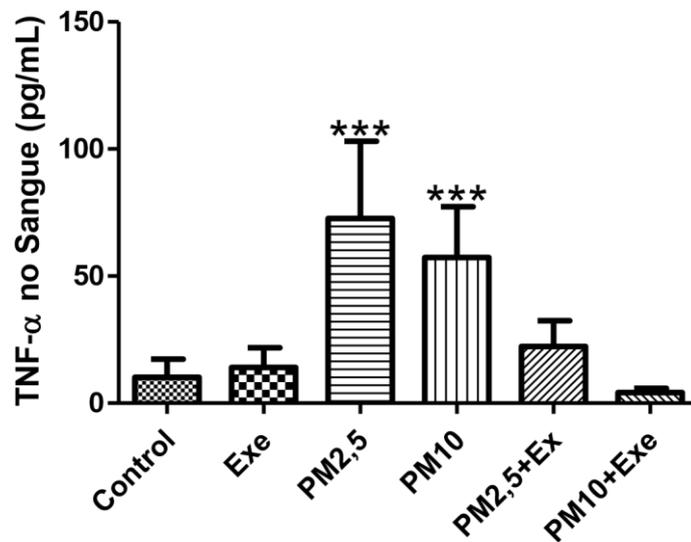
**Figura 12.** \*\*\* $p < 0.001$  comparado a todos os demais grupos.

A figura 13 apresenta os efeitos do treinamento físico realizado concomitantemente à exposição do material particulado sobre o número de TNF- $\alpha$  no lavado broncoalveolar (LBA). Os resultados demonstraram que a exposição tanto ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) quanto PM 10 ( $p < 0.001$ ) resultaram num aumento do acúmulo de TNF- $\alpha$  no lavado broncoalveolar (LBA) quando comparado a todos os demais grupos. Além disso, a figura 13 também demonstra que o treinamento físico aeróbio de intensidade leve, realizado concomitantemente à exposição ao material particulado, foi capaz de inibir completamente esse acúmulo, seja para os animais expostos ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) ou ao material particulado PM 10 ( $p < 0.001$ ).



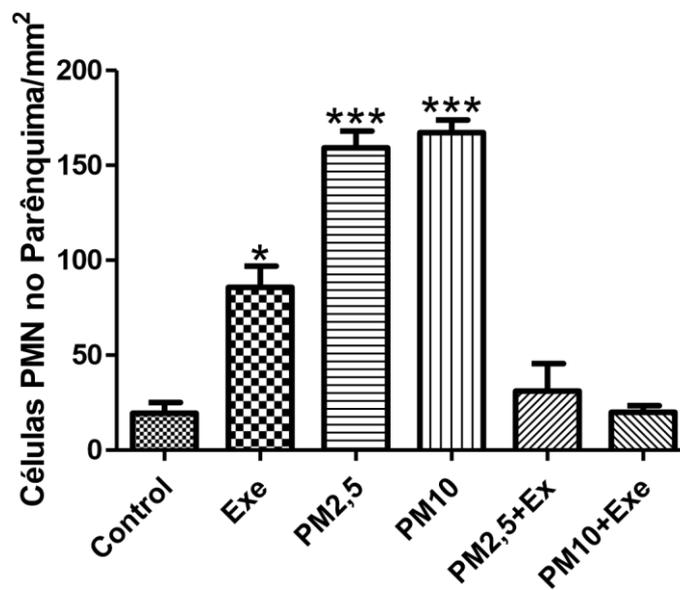
**Figura 13.** \*\*\* $p < 0.001$  comparado a todos os demais grupos.

A figura 14 apresenta os efeitos do treinamento físico realizado concomitantemente à exposição do material particulado sobre o número de TNF- $\alpha$  no sangue. Os resultados demonstraram que a exposição tanto ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) quanto PM 10 ( $p < 0.001$ ) resultaram num aumento do acúmulo de TNF- $\alpha$  no sangue quando comparado a todos os demais grupos. Além disso, a figura 14 também demonstra que o treinamento físico aeróbio de intensidade leve, realizado concomitantemente à exposição ao material particulado, foi capaz de inibir completamente esse acúmulo, seja para os animais expostos ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) ou ao material particulado PM 10 ( $p < 0.001$ ).



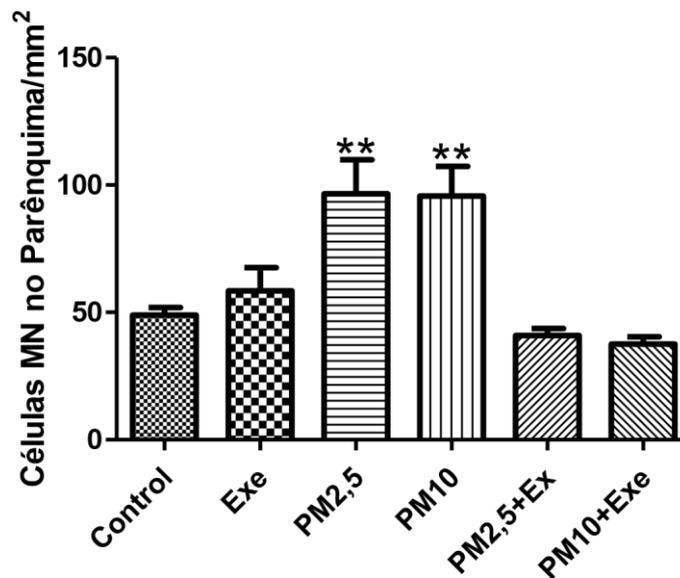
**Figura 14.** \*\*\* $p < 0.001$  comparado a todos os demais grupos.

A figura 15 apresenta os efeitos do treinamento físico realizado concomitantemente à exposição do material particulado sobre o número de células PMN no parênquima. Os resultados demonstraram que a exposição tanto ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) quanto PM 10 ( $p < 0.001$ ) e nos animais não expostos ao material particulado (grupo Exe;  $p < 0.05$ ), resultaram num aumento do acúmulo de células PMN no parênquima quando comparado a todos os demais grupos. Além disso, a figura 15 também demonstra que o treinamento físico aeróbio de intensidade leve, realizado concomitantemente à exposição ao material particulado, foi capaz de inibir completamente esse acúmulo, seja para os animais expostos ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) ou ao material particulado PM 10 ( $p < 0.001$ ).



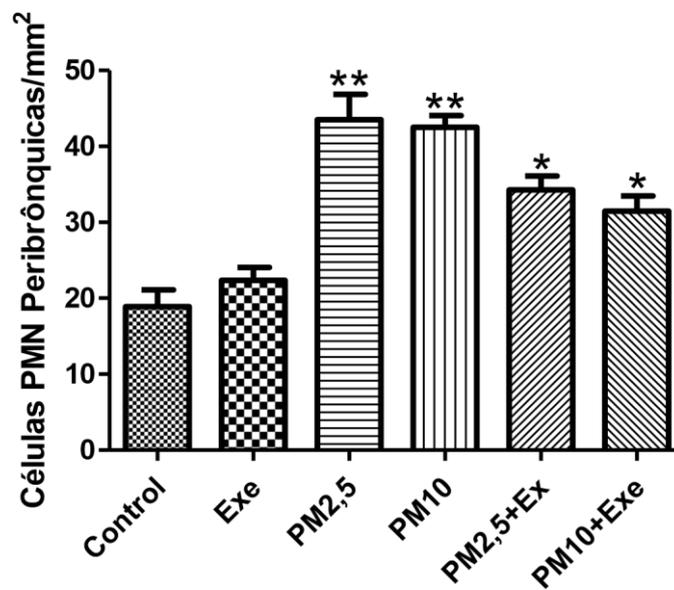
**Figura 15.** \*\*\* $p < 0.01$  comparado a todos os demais grupos.

A figura 16 apresenta os efeitos do treinamento físico realizado concomitantemente à exposição do material particulado sobre o número de células MN no parênquima. Os resultados demonstraram que a exposição tanto ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.01$ ) quanto PM 10 ( $p < 0.01$ ) resultaram num aumento do acúmulo de células MN no parênquima quando comparado a todos os demais grupos. Além disso, a figura 16 também demonstra que o treinamento físico aeróbio de intensidade leve, realizado concomitantemente à exposição ao material particulado, foi capaz de inibir completamente esse acúmulo, seja para os animais expostos ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.01$ ) ou ao material particulado PM 10 ( $p < 0.01$ ).



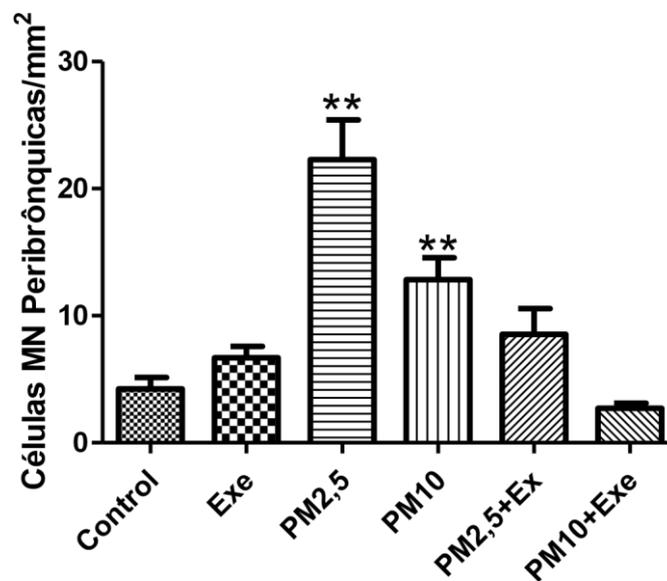
**Figura 16.** \*\*\* $p < 0.01$  comparado a todos os demais grupos.

A figura 17 apresenta os efeitos do treinamento físico realizado concomitantemente à exposição do material particulado sobre o número de células PMN no espaço peribrônquico. Os resultados demonstraram que a exposição tanto ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.01$ ) quanto PM 10 ( $p < 0.01$ ) resultaram num aumento do acúmulo de células PMN no espaço peribrônquico quando comparado a todos os demais grupos. Além disso, a figura 17 também demonstra que o treinamento físico aeróbico de intensidade leve, realizado concomitantemente à exposição ao material particulado, foi capaz de inibir completamente esse acúmulo, seja para os animais expostos ao material particulado PM 2.5 ( $p < 0.01$ ) ou ao material particulado PM 10 ( $p < 0.01$ ).

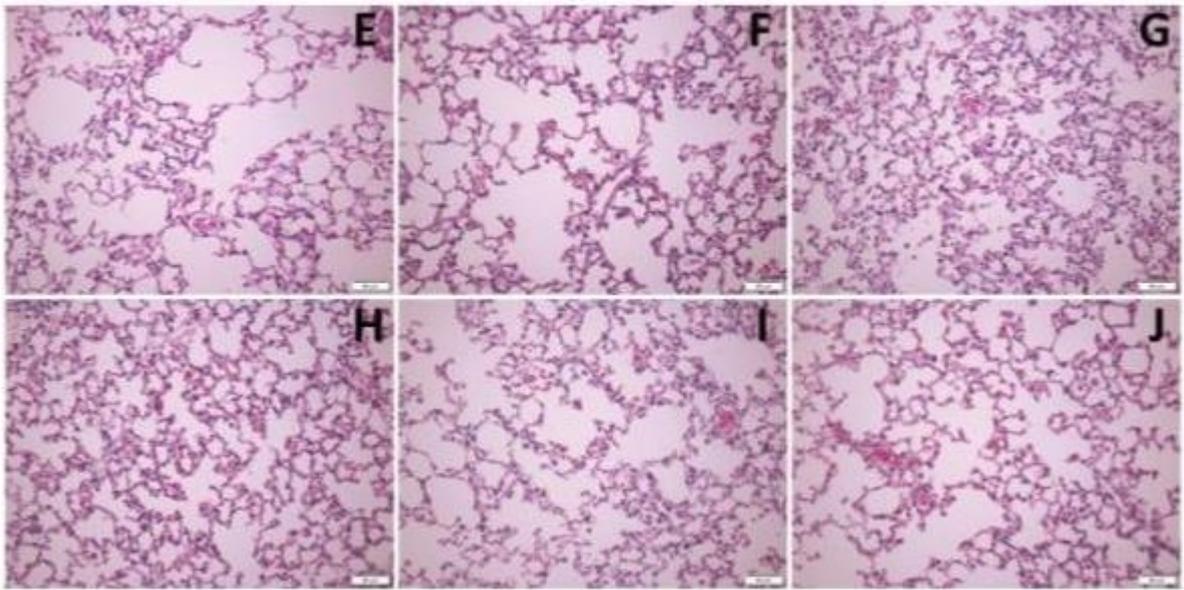


**Figura 17.** \*\*\* $p < 0.01$  comparado a todos os demais grupos.

A figura 18 apresenta os efeitos do treinamento físico realizado concomitantemente à exposição do material particulado sobre o número de células MN no espaço peribrônquico. Os resultados demonstraram que a exposição tanto ao material particulado PM 2.5 ( $p<0.01$ ) quanto PM 10 ( $p<0.01$ ) resultaram num aumento do acúmulo de células MN no espaço peribrônquico quando comparado a todos os demais grupos. Além disso, a figura 17 também demonstra que o treinamento físico aeróbio de intensidade leve, realizado concomitantemente à exposição ao material particulado, foi capaz de inibir completamente esse acúmulo, seja para os animais expostos ao material particulado PM 2.5 ( $p<0.01$ ) ou ao material particulado PM 10 ( $p<0.01$ ).



**Figura 18.** \*\* $p<0.01$  comparado a todos os demais grupos.



**Figura 19** Mostra as fotomicrografias representativas de lâminas coradas com hematoxilina e eosina dos grupos Controle, Exe, PM 2,5, PM 10, PM 2,5 + Exe e PM 10 + Exe, com aumento de 400x.

## 5. Discussão

O presente estudo demonstrou os efeitos pró-inflamatórios pulmonares e sistêmicos resultantes da exposição ao material particulado PM<sub>2.5</sub> e PM<sub>10</sub>, assim como dos efeitos do treinamento físico aeróbio sobre essa resposta.

A exposição ao material particulado (PM) no desenvolvimento da capacidade física, os resultados demonstraram que tanto os animais não expostos ao material particulado (grupo Exe), quanto os animais exercitados e expostos ao material particulado (PM 2,5 + Exe e PM 10 + Exe) apresentaram uma melhora da capacidade do exercício conforme evidenciado pelo aumento do tempo de exercício durante o teste físico. Por outro lado, as informações disponíveis sobre praticantes de atividade física expostos diariamente aos produtos da poluição atmosféricos são escassas e contraditórias à essa observação. Segundo Oliveira et al, 2006 mulheres saudáveis do corpo de bombeiros expostas agudamente à poluição apresentaram um desempenho diminuído em exercícios sub-máximos.

No presente estudo o material particulado (PM) de maneira geral foi capaz de demonstrar uma resposta pró-inflamatória mais elevada nos grupos expostos sem o treinamento físico como no grupo PM 2,5 e quanto no grupo PM 10. Além disso, o presente estudo também demonstra que o treinamento físico aeróbico de intensidade leve, concomitante à exposição ao material particulado (PM), foi capaz de inibir essas ações pró-inflamatória nesses animais expostos ao material particulado PM 2,5 ou ao material particulado PM<sub>10</sub>.

Achado nesses resultados desse trabalho os animais experimentais reagiram com um aumento de células totais no lavado broncoalveolar (LBA) nos grupos PM

2,5 e PM10 comparado com os demais grupos (control, PM 2,5 + Exe e no PM10 + Exe). Animais do grupo que foi exposto ao material particulado e realizado o treinamento físico foram capazes de inibir completamente esse acúmulo de células totais no lavado broncoalveolar. Ainda no broncoalveolar os números de macrófagos, linfócitos, neutrófilos foi maior nos grupos expostos ao material particulado PM 2,5 e no grupo PM10 comparados com os grupos control e sem diferença estatísticas nos grupos PM 2,5 + Exe e no grupos PM10 + Exe. Os mesmos resultados foram observados no sangue.

De maneira geral, os efeitos inflamatórios do material particulado no sistema imunológico e reage como visto nesses resultados obtidos nesse trabalho aumento das citocinas anti-inflamatórias. Os resultados demonstraram um aumento, tanto no lavado broncoalveolar e como no sangue, de citocinas pró-inflamatória como a IL-1 $\beta$ , CXCL-1/KC, TNF- $\alpha$ .

Os efeitos protetores do treinamento físico aeróbico são mediados via interação dos sistemas imunológico e neurotransmissores, através dos sinais moleculares na forma de hormônios, citocinas e neurotransmissores (Petersen e Pedersen, 2005) O treinamento físico modula a resposta inata e adquirida (Petersen e Pedersen, 2005; Vieira et al., 2007; Vieira et al., 2008a) como observada a diminuição de citocinas pró-inflamatórias e aumento da citocina anti-inflamatória IL10, tanto no lavado broncoalveolar quanto no sangue

## **6. Conclusão**

Os resultados do presente estudo sugerem que o treinamento físico aeróbico de intensidade leve realizado concomitantemente à exposição ao material particulado, é capaz de inibir a inflamação pulmonar e sistêmica causada pela poluição atmosférica.

## 7. Referências Bibliográficas

- Adar, S.D.; Gold, D. R.; Coull, B.A.; Schuartz, J. Stone, P.H.; Suh, H. Focused exposures to airborne traffic particles and heart rate variability in the elderly. *Epidemiology*. 2007. 18(1):95-103.
- AEA. 2013. Poluição Atmosférica. “<http://www.eea.europa.eu/pt/themes/air/intro>, consultado em maiode 2016
- Alessandrini F, Schulz H, Takenaka S, Lentner B, Karg E, Behrendt H, Jakob T. Effects of ultrafine carbon particle inhalation on allergic inflammation of the lung. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Apr;117(4):824-30.
- Arantes-Costa FM, Lopes FD, Toledo AC, Magliarelli-Filho PA, Moriya HT, CarvalhoOliveira R, Mauad T, Saldiva PH, Martins MA. Effects of residual oil fly ash (ROFA) in mice with chronic allergic pulmonary inflammation. *Toxicol Pathol*. 2008;36(5):680-6.
- Bascom, R.; Bromerg, P.A.; Costa, D.A.; Devlin, R.; Dockery, D.W.; Frampton, M>W.; Lambert, W.; Samet, J.M.; Speizer, F.E.; Utell, M. Health effects of outdoor pollution. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 153,p. 3-50. 1996.
- Boule NG, Haddad E, Kenny GP, Wells GA, and Sigal RJ. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. *JAMA* 286: 1218–1227, 2001.
- Boyce, M.; Robergs, R.A.; Avasthi, P.; Roldan, C.; Foster, A.; Montner, P.; Stark, D.; Nelson, C. Exercise training by individual with predialysis renal failure: cardiorespiratory endurance, hypertension and reanl function. *Am J Kidney Dis*. 1997; 30(2): 180-192
- Brook, R. D. cardiovascular effects of air pollution. *Clinical science*, 2008. 115, 175187.
- Brunekreef, B.; Holgate, S.T. Air pollution and health. *Lancet*. 2002. 360: 1233-42
- Burgan, O.; Smargiassi, A.; Perron, S.; Kosatsky, T. Cardiovascular effects of subdaily leves of ambient fine particles: systematic review. *Environ. Health* 2010. 15;9:26.
- Carter, J.D.; Ghio, A.J.; Samet, J.M.; Reed, W.; Delvin, R.B. In vitro exposure of human airway apithelial cells to an air pollution particle induces IL-6, IL8 and TNFa protein expression. *Am Respir. Crit. Care Med.*, v. 155, p. A256, 1997. Supplement.
- Conselho nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução 03 de 28.06.1990. Estabelece padrões para a qualidade do ar. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 20.08.2010.

Craig, L.; Brook, J.R.; Chiotti, Q.; Croes, B.; Gower, S.; Hedley, A.; Krewski, D.; Krupnick, A.; Krzyzanowski, M.; Moran, M.D.; Pennel, W.; Samet, J.M.; Scheneider, J.; Shortreed, J.; Williams, M. Air pollution. And public health: a guidance document for risk managers. *J. Toxicol. Environ. Health.* 2008. A.;71(9-10): page 589;588-698.

Dockery, D.W. Health Effects of particulate Air Pollution. *Ann. Epidemiol.* 2009. 19:257-263.

Dockery, D.W.; POPE III, C.A. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu. Rev. Public. Health*, v.15, 1.107-32, 1994.

Fanelli A, Cabral AL, Neder JA, Martins MA, Carvalho CR. Exercise training on disease control and quality of life in asthmatic children. *Med Sci Sports Exerc.* 2007 Sep;39(9):1474-80.

Feng, J.; Yang, W. Effects of particulate air pollution on cardiovascular health: a population health risk assessment. *PLoS One.*; 2012. 7(3):e33385.

Gaffney, J.S., Merley, N., e Frederick, J.E..2004. "Formation and Effects of Smog. "Environmental and Ecological Chemistry. Vol. II. Illinois.

Goldlesk, J.; Siotas, C.; Verrier, R.L.; Killingsworth, C.R.; Lovett, E.; Koutrakis, P. Inhalation exposure of canines to concentrated ambient air particles, *Am. J. Resp. Crit. Care med.*, v.155, p. A246, 1997.

Gonçalves RC, Nunes MPT, Cukier A, Stelmach R, Martins MA, Carvalho CRF. Efeito de um programa de condicionamento físico aeróbio nos aspectos psicossociais, na qualidade de vida, nos sintomas e no óxido nítrico exalado de portadores de asma persistente moderada ou grave. *Rev Bras Fisioter* 12(2):127135, 2008.

Gouveia, N.; Freitas, C.U.; Martins, L.C.; Marcilio, I.O. Hospitalizações por causa respiratórias e cardiovasculares associadas à contaminação atmosférica no Município de São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Publica*, Rio de Janeiro, 2006. 22(12): 2669-2677.

Grahame, T.J.; Schelessinger, R.B. Oxidative Stress-Induced telomeric Erosion as a Mechanism Underlying Airborne Particulate matter-Related Cardiovascular Disease. *Part. Fibre. Toxicol* 2012. 19.9(1):21.

Hatch, G.E.; Boykin, E.; Graham, J.A.; Lewtas, J.; Pott, F.; Loud, K.; Mumford, J.S. Inhalable particles and pulmonary host defense: in vitro and vivo effects of ambient air and combustion particles. *Environ. Res.*, v, p. 67-80, 1985.

Hewitt M, Creel A, Estell K, Davis IC, Schwiebert LM. Acute Exercise Decreases Airway Inflammation, but not Responsiveness, in an Allergic Asthma Model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008 Jul 17. [Epub ahead of print].

Hutson, P.A.; Varley, J.G.; Sanjar, S.; Kings, M.; Holgate, S.T.; Church, M.K. Evidence that neutrophils do not participate in late phase airway response provoked by ovalbumin inhalation in conscious, sensitized guinea pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.*, v. 141, p. 535-9, 1990.

Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Willart MA, Muskens F, Hoogsteden HC, Luttmann W, Ferrari D, Di Virgilio F, Virchow JC Jr, Lambrecht BN. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med.* 2007 Aug;13(8):913-9.

Jia, X.; Song, X.; Shima, M.; Tamura, K.; Deng, F.; Guo, X. Effects of fine particulate on heart rate variability in Beijing: a panel study of healthy elderly subjects. *Int. Arch. Environ. Health.* 2012. 85:97-107.

Johansen, K.L. Exercise in the end-stage renal disease population. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18; 1845-1854.

Jolliffe JA, Rees K, Taylor RS, Thompson D, Oldridge N, Ebrahim S. Exercise-based rehabilitation for coronary heart disease. *Cochrane Database Syst Rev* 4: CD001800, 2000.

Keuken, M.P.; Jonkers, S.; Voogt, M. e Den, S. E. V.. 2012. "Elemental Carbon as an Indicator for Evaluating the Impact of Traffic measures on Air Quality and Health." *Atmospheric Environment* 61:1-8. Doi:10.1016/j.atmosenv.2012.07.009.

Knap, B.; Buturovic-Ponikvar, J.; Ponikvar, R.; Bren, A.F. Regular exercise as a part of treatment for patients with end-stage renal disease. *Therap Apher dial.* 2005; 9 (3): 211-213.

Kutner, N. How can exercise be incorporated into the routine care of patients on dialysis? *Int Urol Nephrol.* 2007; 39 1281-1285.

Lacasse Y, Brosseau L, Milne S, Martin S, Wong E, Guyatt GH, and Goldstein RS. Pulmonary rehabilitation for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev* 3: CD003793, 2002.

Langrish, J.P.; Bosson, J.; Unosson, J.; Muala, A.; Newby, D.E.; Mills, N.L.; Blomberg, A.; Sandstrom, T. Cardiovascular effects of particulate air pollution exposure: time course and underlying mechanisms. *J. Intern. Med.* 2012 Sep; 272(3):224-39. Doi: 10.1111/j.1365.2012.02566.x

Li R, Meng Z, Xie J. Effects of sulfur dioxide on the expressions of EGF, EGFR, and COX-2 in airway of asthmatic rats. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2008 May;54(4):748-57.

- Mansur, H.N.; Lima, J. R.P.; Novaes, J.S. Nível de atividade física e risco cardiovascular de pacientes com doença renal crônica. *J Bras Nefrol.* 2007; 29(4):209-4.
- Masini E, Giannini L, Nistri S, Cinci L, Mastroianni R, Xu W, Comhair SA, Li D, Cuzzocrea S, Matuschak GM, Salvemini D. Ceramide: a key signaling molecule in a Guinea pig model of allergic asthmatic response and airway inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Feb;324(2):548-57.
- McArdle, W.D.; Katch, V.L. *Fisiologia do exercício – Energia, Nutrição e Desempenho Humano.* 1996; 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.
- Miller, B.W.; Cress, C.L.; Johnson, M.; Nichols, D.H.; Schnitzler, M.A. Exercise during hemodialysis decreases the use of antihypertensive medications. *Am J Kidney Dis* 2002, 39(4): 828-833.
- Mullen, J.B.; Wright, J.L.; Wiggs, B.R.; Pare, P.D.; Hogg, J.C. Reassessment of inflammation of airways in chronic bronchitis. *Br. Med. J.*, v. 291, p. 1235-1985.
- Mussi RK, Camargo EA, Ferreira T, De Moraes C, Delbin MA, Toro IF, Brancher S, Landucci EC, Zanesco A, Antunes E. Exercise training reduces pulmonary ischaemia-reperfusion-induced inflammatory responses. *Eur Respir J.* 2008 Mar;31(3):645-9.
- Organização Mundial de Saúde. WHO air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. 2005.
- Pastva A, Estell K, Schoeb TR, Atkinson TP, Schwiebert LM. Aerobic exercise attenuates airway inflammatory responses in a mouse model of atopic asthma. *J Immunol.* 2004 Apr 1;172(7):4520-6.
- Pastva A, Estell K, Schoeb TR, Schwiebert LM. RU486 blocks the anti-inflammatory effects of exercise in a murine model of allergen-induced pulmonary inflammation. *Brain Behav Immun.* 2005 Sep;19(5):413-22.
- Pauwels, R.; Kips, J.; Peleman, R.; Straeten, M.V.D. The effects of endotoxin inhalation on airway responsiveness and cellular influx in rats. *Am. Rev. Respir. Dis.*, v. 141, p. 540-5, 1990.
- Pechter, U.; Maarros, J.; Mesikepp, S.; Veraskits, A.; Ots, M. Regular low-intensity aquatic exercise improves cardio-respiratory functional capacity and reduces proteinuria in chronic renal failure patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18: 624625.
- Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol.* 2005 Apr;98(4):1154-62.

Petersen, A.M.; Pedersen, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol.* 2005; 98:1154-1162.

Pope III, C.A.; Hansen, M.L.; Long, R.W.; Nielsen, K.R.; Eatough, N.L.; Wilson, W.E.; Eatough, D.J. Ambient Particulate air pollution, Heart rate variability, and, blood markers of inflammation in a Panel of Elderly Subjects. *Environ. Health perspect.* 2004. 112:339-345.

Ribero, D.H.R.F.; Sasaki, C.; Lorenzi-Filho, G.; Saldiva, P.H.; PM 2.5 induces acute electrocardiographic alterations in healthy rats. *Environment Research*, 2005. Vol. 99, p:262-266.

Saldivia, P.H. – Air pollution and our lung disease patients. *J Bras. Pneumol.* 2008.;34(1):1.

Shi, M.M.; Godleski, J.J.; Paulauskis, J.D. Elevation of KC (cytokine-induced neutrophil chemoattractant) mRNA in alveolar macrophages by quino-induced oxidative stress. *Am J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 153, p A30, 1996.

Shrey, K.; Suchit, A.; Deepika, D.; Shuruti, K; Vibha, R. Air pollutants: the key stages in the pathway towards the development of cardiovascular disorders. *Environ Toxicol. Pharmacol.*; 2011. 31(1):1-9.

Sierra-Vargas, M.P.; Teran, L.M. Air Pollution: Clinical Impact and Prevention. *Respirology.* 2012. Jun 22. Doi: 10.1111/j.1440-1843.2012.02213.x.

Stevens JF, Maier CS. Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res.* 2008 Jan;52(1):7-25.

Svartengren M, Strand V, Bylin G, Järup L, Pershagen G. Short-term exposure to air pollution in a road tunnel enhances the asthmatic response to allergen. *Eur Respir J.* 2000 Apr;15(4):716-24.

Svending, U..2010. "Urban Development and the Environmental Challenges – 'green' Systems Considerations." *Cities of Tomorrow*, 43. Doi:10.1007/978-3-319-148830\_7.

Thompson, A.; Daughton, D.; Robbins, R.; Ghafouri, M.; Oehlerking, M.; Rennard, S. Intraluminal airway inflammation on chronic bronchitis. *Am rev. Respir. Dis.*, v. 140, p 1527-1989.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Air quality criteria for particulate matter, v 2. EPA/600/P-95/0015F. 1996.

Vanoirbeek JA, Toussaint G, Nemery B, Hoet PH. Reduced exercise capacity in a mouse model of asthma. *Thorax.* 2006 Aug;61(8):736-7.

Vieira RP, Claudino RC, Duarte AC, Santos AB, Perini A, Faria Neto HC, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Nov 1;176(9):871-7.

Vieira RP, de Andrade VF, Duarte AC, Dos Santos AB, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Aerobic Conditioning and Allergic Pulmonary Inflammation in mice II: Effects on Lung Vascular and Parenchymal Inflammation and Remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008a Aug 29. [Epub ahead of print].

Vieira RP, Duarte AC, Silva RA, Dos Santos AB, Medeiros MCR, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Aerobic exercise decreases oxidative and nitrosative stress in a model of asthma. Aceito para apresentação no European Respiratory Congress 2008b, Berlin, Alemanha.

Walters, D.M.; breysse, B.G.Jr.; Wills-KARP, M. Comparison of effects of various sources os particulate matter on pulmonary inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 159, p. A25, 1999.

WHO. Health Guideline for Vegetation Fire Events, ed. Schwela, D.H.; Goldammer, J>g.; Morawska, L.H. Simpson, O. Geneva, World Health organization, 1999.

Wold, L.E.; Ying, Z.; Hutchinson, K.R.; velten, M.; Gorr, M.W.; Velten, C.; Youtz, D.J.; Wang, A.; Lucchesi, P.A.; Sun, Q.; Rajagopalan, S. Cardiovascular remodeling in response to long-term exposure to fine particulate matter air pollution. *Circ. Heart fail*. 2012. 1;5(4):452-61.

Zereba, W.; Nomura, A.; Couderc, J.P. Cardiovascular effects of air pollution: What to measure in ECG? *Environ. Healthl Perspect*. 2001. 109 Suppl. \$:533-8.

Zieker, D.; Zieker, J.; Burnet, M.; Northoff, H.; Fehrenbach, E. CDNA-microarray analysis as a research tool for expression profiling in human peripheral blood following. *Exerc Immunol rev*. 2005; 11:86-96.

## 8. Anexos

### 8.1. Anexo I – Aprovação do comitê de ética



## APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28/04/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1225/09**, intitulado: **"EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NAS ALTERAÇÕES PULMONARES INDUZIDAS POR DIFERENTES PRODUTOS DA POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA"**, apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **PROFA. DRA. MARISA DOLHNIKOFF**

Pesquisador (a) Executante: **RODOLFO DE PAULA VIEIRA**

CAPPesq, 28 de abril de 2010

**PROF. DR. EDUARDO MASSAD**  
Presidente

**Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa**

## 8.2. Anexo II – Artigo submetido para publicação

### Section Immunology

#### Chronic Exercise Performed under Particulate Matter Exposition Inhibits Lung Injury

Adriano Silva-Renno<sup>1\*</sup>, Guilherme Cristianini Baldivia<sup>1\*</sup>, Manoel Carneiro Oliveira-Junior<sup>1\*</sup>, Maysa Alves Rodrigues Brandao-Rangel<sup>1</sup>, Elias El-Mafarjeh<sup>1</sup>, Marisa Dolhnikoff<sup>2</sup>, Thais Mauad<sup>2</sup>, Paulo Hilario Saldiva<sup>2</sup>, Ana Paula Ligeiro de Oliveira<sup>1</sup>, Gustavo Silveira Graudenz<sup>1\*</sup>, Rodolfo Paula Vieira<sup>1\*</sup>

1- Laboratory of Pulmonary and Exercise Immunology (LABPEI) and Brazilian Institute of Teaching and Research in Pulmonary and Exercise Immunology (IBEPIPE), Nove de Julho University (UNINOVE), Rua Vergueiro 235/249, São Paulo – SP, Brazil, 01504-001.

2- Laboratory of Experimental Air Pollution (LIM 5), School of Medicine, University of Sao Paulo, Av Doutor Arnaldo 455, São Paulo – SP, Brazil, 01246-903.

\* ASR, GCB, MCOJ, GSD and RPV have equally contributed to this study.

**Running head:** Exercise protects from pollution.

#### Corresponding author

Rodolfo Paula Vieira, Prof. Dr.

Laboratory of Pulmonary and Exercise Immunology (LABPEI) and Brazilian Institute of Teaching and Research in Pulmonary and Exercise Immunology (IBEPIPE)

Nove de Julho University (UNINOVE)

Rua Vergueiro 235/249, São Paulo – SP, Brazil, 01504-001.

Phone/FAX: +55 11 3385-9003

E-mail: rodrelena@yahoo.com.br

## Abstract

Air pollution is a growing problem worldwide, inducing and exacerbating several diseases. Among the several components of air pollutants, particulate matters (PM), especially thick (10-2,5 $\mu$ m; PM 10) and thin ( $\leq$ 2,5 $\mu$ m; PM 2.5), are breathable particles that easily can be deposited into the lungs, resulting in lung and systemic inflammation. Although physical activity is strongly recommended, its effects when practiced in polluted environments are questionable. Therefore, the present study evaluated the pulmonary and systemic response of concomitant treadmill training with PM 2.5 and PM 10 exposure. Treadmill training inhibited PM 2.5 and PM 10-induced accumulation of total leukocytes ( $p < 0.001$ ), neutrophils ( $p < 0.001$ ), macrophages ( $p < 0.001$ ) and lymphocytes ( $p < 0.001$ ) in bronchoalveolar lavage (BAL), as well as the BAL levels of IL-1 $\beta$  ( $p < 0.001$ ), CXCL1/KC ( $p < 0.001$ ) and TNF- $\alpha$  ( $p < 0.001$ ), while increased IL-10 levels ( $p < 0.05$ ). Similar effects were observed on accumulation of polymorphonuclear ( $p < 0.01$ ) and mononuclear ( $p < 0.01$ ) cells in the lung parenchyma and in the peribronchial space. Treadmill training also inhibited PM 2.5 and PM 10-induced systemic inflammation, as observed in the number of total leukocytes ( $p < 0.001$ ), and in the plasma levels of IL-1 $\beta$  ( $p < 0.001$ ), CXCL1/KC ( $p < 0.001$ ) and TNF- $\alpha$  ( $p < 0.001$ ), while increased IL-10 levels ( $p < 0.001$ ). Chronic treadmill training inhibits lung and systemic inflammation induced by particulate matter exposure.

**Key words:** exercise immunology, lung immunology, air pollution, particulate matter, lung inflammation.

## Introduction

Air pollution is a growing problem worldwide, inducing and exacerbating several diseases (Ruttens et al 2016; Wong et al 2016). Air pollution is composed by combination of solid particles with different aerodynamic diameters and by toxic gases (Voliotis et al 2016). The most common pollutants found in the atmosphere are the particulate matter (PM) and the gases ozone (O<sub>3</sub>), sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>), carbon monoxide (CO) and nitrogen oxide (NO<sub>x</sub>) (Voliotis et al 2016). Among these several components of air pollutants, particulate matters (PM), especially thick (10-2,5µm; PM 10) and thin ( $\leq 2,5$  µm; PM 2.5), are breathable particles that easily can be deposited into the lungs, resulting in lung and systemic inflammation (Wong et al 2016). The aerodynamic diameter of the particles is particularly important, since the deposition of the particles in different regions of the lungs are finely related to the particles size and are also related with mortality (Ruttens et al 2016; Voliotis et al 2016).

Although air pollution can induce a microenvironment for development of several diseases, air pollution represents a serious health risk especially for susceptible individuals (Ruttens et al 2016). In this way, situations that could increase the exposition and potentiate deposition of air pollutants into the lungs should be avoided (Zhang et al 2016). Therefore, although physical activity is strongly recommended for its all well-known health benefits, its effects when practiced in polluted environments are questionable (Jacobs et al 2010; Vieira et al 2012; Giles et al 2014; Lü et al 2015).

Therefore, the present study investigated for the first time, the pulmonary and systemic inflammatory response to low intensity aerobic exercise performed concomitantly to two different particulate matter, PM 2.5 and PM 10.

## **Material and Methods**

This study was approved by the review board for human and animal studies of the School of Medicine of the University of São Paulo and by Nove de Julho University (1225/09). Furthermore, the study presented in this manuscript was conducted ethically in accordance to international standards and as required by the International Journal of Sports Medicine (Harris and Atkinson 2016).

### **Particulate Matter 2.5 (PM 2.5) and 10 (PM 10) Collection and Separation**

The particulate matter was collected in polycarbonates filters and separated per the particles size (PM 2.5 and PM 10) by using a gravimetric collector in the School of Medicine of University of Sao Paulo, and gently given by Prof. Dr. Paulo HilárioSaldiva.

After separation, PM 2.5 and PM 10 was suspended in 0,9% NaCl at a final concentration of 1mg/mL.

### **Animals and Experimental Protocol**

Forty-eight male C57Bl/6 mice (6-8 weeks age) were obtained from Central Animal Facility of School of Medicine of University of Sao Paulo and maintained in the Animal Facility of Nove de Julho University, under controlled conditions of humidity, temperature and luminosity. The animals were distributed into six groups (n=8 each group) as follows: Control (non-exercisedand non-PM instilled), Exercise

(Exe; exercised and non-PM instilled), PM 2.5 (non-exercised and PM 2.5 instilled), PM 10 (non-exercised and PM 10 instilled), PM 2.5+Ex (exercised and PM 2.5 instilled) and PM 10+Ex (exercised and PM 10 instilled).

Each mouse received 10 $\mu$ L by nasal drop instillation of PM 2.5 or PM 10, while non-PM groups received only the vehicle (0,9% NaCl) (Vieira et al 2012). For exercised groups, the animals received the nasal drop instillation 10 minutes after the beginning of treadmill training, to simulate the pollutants inhalation during exercise.

The instillations occurred 5x/week during the 5 weeks of the experimental protocol (Vieira et al 2012).

Before the beginning of treadmill training, the animals were adapted to the treadmill for rodents (Super ATL, Imbramed, RS, Brazil) during 3 consecutive days (15 minutes, 25% inclination, 0,2 Km/h) (Vieira et al 2012). After that, a maximal exercise capacity test was performed to allow us to determinate the intensity of exercise training, which was set up to low intensity, corresponding to 50% of maximal exercise capacity reached in the initial test (Vieira et al 2012). Treadmill training was performed 5x/week, 60 minutes per session, during 5 weeks. A final exercise test was performed 24 hours before the animals' euthanasia (Vieira et al 2012).

### **Pulmonary Inflammation**

Pulmonary inflammation was assessed through the total and differential cellular counting in bronchoalveolar lavage (BAL) and by quantitative image analysis of the number of polymorphonuclear and mononuclear cells in the lung parenchyma and in the peribronchial space (Vieira et al 2007; Vieira et al 2008; Vieira et al 2010; Vieira et al 2012; Oliveira et al 2014).

For BAL collection and analysis, mice were cannulated and the lungs gently washed for 3 times by using 0.5 mL of phosphate buffered saline (PBS) (Oliveira et al

2014). The volume collected was centrifuged and the supernatant stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for cytokines analysis (Oliveira et al 2014). The cell pellet was resuspended in 1 mL of PBS and the cells were counted using a hemacytometer (Neubauer chamber; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) (Oliveira et al 2014). An aliquot of the resuspended cell pellet was used for cytopsin slides preparation, which were stained with Diff Quick (Medion Diagnosis, Düdigen, Switzerland) and 300 cells were counted, in a blinded fashion for the groups description, using the hematological criteria (Oliveira et al 2014).

For quantitative histological analysis, the lungs were removed in block and fixed in 10% formalin for 24 hours and then submitted to histological routine. Four micrometer thick slides were stained with hematoxylin and eosin and the number of polymorphonuclear and mononuclear cells were counted in the lung parenchyma and in the peribronchial space. The results were expressed in number of cells/ $\text{mm}^2$  of lung tissue for lung parenchyma (Vieira et al 2008; Vieira et al 2010; Vieira et al 2012; Oliveira et al 2014) and in number of cells/ $\text{mm}^2$  of peribronchial area. All lungs of all mice from all experimental groups were used and 15 random fields of lung parenchyma were assessed (Vieira et al 2008; Vieira et al 2010; Vieira et al 2012; Oliveira et al 2014) and 5 peribronchial spaces were assessed at 400x magnification (Vieira et al 2007).

### **Pulmonary and Systemic Cytokines**

The supernatant of bronchoalveolar lavage (BAL) and the plasma were used to quantify the levels of IL-1beta, IL-6, CXCL1/KC, IL-10, IL-17, IL-23 and TNF-alpha by ELISA, according the manufacturer's instructions (R&D Systems, MN, USA) (Vieira et al 2012; Oliveira et al 2014).

### **Statistical Analysis**

Graph Pad Prism 5.0 software was used to perform the statistical analysis and to build the graphs. The one-way analysis of variance was applied followed by Bonferroni post hoc test for comparison between the groups for all data, since all data presented parametric distribution.

## **Results**

### **Particulate Matter (PM) Exposure Did Not Inhibit Physical Capacity**

#### **Development in Mice**

Figure 1 shows the initial and final time for physical test. The results demonstrated that all groups submitted to exercise improve exercise capacity, demonstrated by increased time during treadmill physical test, independently of exposure to PM. On the other hand, non-exercised mice did not present any improvement in the exercise capacity.

### **Low Intensity Treadmill Training Inhibits Particulate Matter Induced Pulmonary Inflammation**

Figure 2 shows the inflammatory profile in bronchoalveolar lavage (BAL) (Figure 2 A – D) and the levels of cytokines in BAL (Figure 2 E – H). The results demonstrated that chronic exposure to PM 2.5 and to PM 10 resulted in increased number of total cells in BAL [PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) and to PM 10 ( $p < 0.001$ )] compared to Control, Exe, PM 2.5+Exe and PM 10+Exe groups (Figure 2 A). Similarly, chronic exposure to PM 2.5 and to PM 10 resulted in increased number of neutrophils (Figure 2 B), macrophages (Figure 2 C) and lymphocytes (Figure 2 D) in BAL [PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) and to PM 10 ( $p < 0.001$ )] compared to Control, Exe, PM 2.5+Exe and PM 10+Exe groups. These

results reinforce the pro-inflammatory effects of PM and also the protective and anti-inflammatory effects of low intensity aerobic exercise.

The results also demonstrated that chronic exposure to PM 2.5 and to PM 10 resulted in increased release and accumulation of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  (Figure 2 E), CXCL1/KC (Figure 2 F) and TNF- $\alpha$  (Figure 2 G) in BAL [PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) and to PM 10 ( $p < 0.001$ )] compared to Control, Exe, PM 2.5+Exe and PM 10+Exe groups. On the other hand, these results also clearly demonstrate the antiinflammatory effects of low intensity aerobic exercise, since the levels of IL-1 $\beta$ , CXCL1/KC and TNF- $\alpha$  were abrogated in exercised groups. In addition, these antiinflammatory effects of low intensity aerobic exercise can be partially explained by the increased release of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in Exe ( $p < 0.05$ ), PM 2.5+Exe ( $p < 0.05$ ) and in PM 10+Exe ( $p < 0.05$ ) groups when compared with all other groups.

To better discriminate the extension of the effects of low intensity aerobic exercise performed concomitantly in different lungs compartments, a quantitative histological analysis of the density of polymorphonuclear (PMN) and mononuclear (MN) cells in the lung parenchyma and in the peribronchial space were performed (Figure 3 A – J). The results demonstrated that exposure to PM 2.5 and to PM 10 resulted in increased accumulation of PMN cells ( $p < 0.001$ ; Figure 3 A) and MN cells ( $p < 0.001$ ; Figure 3 B) in the lung parenchyma and also of PMN cells ( $p < 0.001$ ; Figure 3 C) and MN cells ( $p < 0.001$ ; Figure 3 D) in the peribronchial space. Figure 3 E – J shows the representative photomicrographs of slides stained with hematoxylin and eosin of Control, Exe, PM 2.5, PM 10, PM 2.5+Exe and PM 10+Exe groups, at 400x magnification.

## **Low Intensity Treadmill Training Inhibits Particulate Matter Induced Systemic Inflammation**

Figure 4 (A – E) shows the effects of PM exposure and of aerobic exercise on systemic inflammation. Figure 4 A shows that PM 2.5 ( $p < 0.001$ ) and PM 10 ( $p < 0.001$ ) increased the number of blood leukocytes compared with all groups, which are completely inhibited by aerobic exercise. The results also show that PM 2.5 and PM 10 exposure, similarly, increased the concentrations of pro-inflammatory cytokines IL- $1\beta$  ( $p < 0.001$ ), CXCL1/KC ( $p < 0.001$ ) and TNF- $\alpha$  ( $p < 0.001$ ) compared with all other groups, which were completely abrogated by aerobic exercise. On the other side, PM 2.5 and PM 10 exposure did not influence the systemic concentration of the anti-inflammatory cytokine IL-10, which presented increased levels for the exercised groups, Exe ( $p < 0.001$ ), PM 2.5+Exe ( $p < 0.001$ ) and PM 10+Exe ( $p < 0.001$ ).

## **Discussion**

The present study showed for the first time that low intensity aerobic exercise performed concomitantly to particulate matter (PM) exposure did not potentialize the pro-inflammatory effects of the air pollution exposure but, on contrary, inhibit the pulmonary and systemic inflammation induced by exposure to PM.

Atmosphere air pollution is constituted by different pollutants, including PM, which are classified mainly by the aerodynamic diameter of the particles (Wong et al 2016). Different sizes of PM can reach different areas of the lungs, beginning from very thick particles ( $>10\mu\text{m}$ ) which are deposited in the upper airways, until thick particles ( $10\text{-}2,5\mu\text{m}$ ; PM 10) which are deposited also in the upper airways and in the main

bronchi, and also thin ( $\leq 2,5 \mu\text{m}$ ; PM 2.5) and ultra-thin ( $\leq 0,1 \mu\text{m}$ ; PM 0.1) particles, which can be deposited in distal airways and in the alveoli (Ruttens et al 2016; Voliotis et al 2016). In the present study, it was observed that PM 2.5 and PM 10 exposure resulted in inflammation of the airways and of the parenchyma, characterized by both polymorphonuclear (PMN) and by mononuclear (MN) cells. These results are particularly important, since airway inflammation is closely related with airway hyperresponsiveness, especially in susceptible individuals, a phenomenon that can limit the exercise practice, by narrowing the airways and reducing the airflow (Abbasi et al 2015; Lauzon and Martin 2016). In this context, is important to note the extension of the anti-inflammatory effects of aerobic exercise in different lung compartments, which can be differentially affected by exposure to PM.

In this case, low intensity aerobic exercise was able to inhibit the accumulation of PMN and MN cells in the lung parenchyma and in the peribronchial space, displaying a large extension of the protective effects of aerobic exercise by different lung compartments.

Another important effect resulting from air pollution exposure is systemic inflammation (Barbhaiya and Costenbader 2016; Lee et al 2016; Pope et al 2016; Wong et al 2016; Zakharenko et al 2016). The importance of systemic inflammation induced by air pollution has been described as an important event mediating the development and exacerbation of several diseases, such as lupus erythematosus (Barbhaiya and Costenbader 2016), Parkinson's disease (Lee et al 2016), endothelial injury (Pope et al 2016), allergy (Zakharenko et al 2016), as well as respiratory diseases, such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (Wong et al 2016). The underlying mechanisms involving air pollution-induced systemic inflammation are, at least partially, attributed to activation of oxidative stress pathway

and pro-inflammatory cytokines and pro-angiogenic factors release (Pope et al 2016). In fact, it has been described that particulate matter increases the number of monocytes, CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes, and increase levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, which are cells and cytokines/chemokines involved in the atherosclerosis process, but also in asthma and COPD pathogenesis (Pope et al 2016). In addition, it has been described that particulate matter also induces the increase in the number of basophils, a cell presenting a central role in systemic and allergic process (Zakharenko et al 2016). In the present study, it was demonstrated that PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> exposure induced increases in the number of total circulating leukocytes and in the levels of IL-1 $\beta$ , CXCL1/KC and TNF- $\alpha$ , which are pro-inflammatory cytokines involved in the pathophysiology of several diseases. On the other hand, the present study also demonstrated that aerobic exercise was able to inhibit cytokine release by exposure to PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub>, pointing out the protective and anti-inflammatory effects of aerobic exercise. However, the evaluation of these effects of aerobic exercise on pathogenesis and/or in the exacerbation of other diseases, which could be addressed by experimental models, as a proof of concept that exercise could inhibit air pollution-induced the development and exacerbation of diseases, were not evaluated.

In conclusion, the present study shows that, at least in the experimental model, the concomitant practice of low intensity aerobic exercise to particulate matter (PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub>) exposure did not worsen the harmful effects of particulate matter exposure, but on contrary, present protective effects.

## References

Abbasi A, Vieira RP, Northoff H. Letter to the editor: the evidence of exercise-induced bronchoconstriction in endurance runners; genetic basis and gender differences. *Exerc Immunol Rev.* 2015;21:186-8

Barbhaiya M, Costenbader KH. Environmental exposures and the development of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 2016 Sep;28(5):497-505.

Giles LV, Brandenburg JP, Carlsten C, Koehle MS. Physiological responses to diesel exhaust exposure are modified by cycling intensity. *Med Sci Sports Exerc.* 2014 Oct;46(10):1999-2006.

Harriss DJ, Atkinson G. Ethical standards in sport and exercise science research: 2016 update. *Int J Sports Med* 2015; 36(14): 1121–1124.

Jacobs L, Nawrot TS, de Geus B, Meeusen R, Degraeuwe B, Bernard A, Sughis M, Nemery B, Panis LI. Subclinical responses in healthy cyclists briefly exposed to traffic-related air pollution: an intervention study. *Environ Health.* 2010 Oct 25;9:64.

Lauzon AM, Martin JG. Airway hyperresponsiveness; smooth muscle as the principal actor. *F1000Res.* 2016 Mar 9;5. pii: F1000 Faculty Rev-306.

Lee PC, Raaschou-Nielsen O, Lill CM, Bertram L, Sinsheimer JS, Hansen J, Ritz B. Gene-environment interactions linking air pollution and inflammation in Parkinson's disease. *Environ Res.* 2016 Nov;151:713-720.

Oliveira MC Jr, Greiffo FR, Rigonato-Oliveira NC, Custódio RW, Silva VR, Damaceno-Rodrigues NR, Almeida FM, Albertini R, Lopes-Martins RÁ, de Oliveira LV, de Carvalho Pde T, Ligeiro de Oliveira AP, Leal Jr EC, Vieira RP. Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS. *J Photochem Photobiol B.* 2014 May 5;134:57-63.

Pope CA, Bhatnagar A, McCracken J, Abplanalp WT, Conklin DJ, O'Toole TE. Exposure to Fine Particulate Air Pollution Is Associated with Endothelial Injury and Systemic Inflammation. *Circ Res.* 2016 Oct 25. pii: CIRCRESAHA.116.309279. [Epub ahead of print].

Ramos DS, Olivo CR, Quirino Santos Lopes FD, Toledo AC, Martins MA, Lazo Osório RA, Dolhnikoff M, Ribeiro W, Vieira RP. Low-intensity swimming training partially inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Med Sci Sports Exerc.* 2010 Jan;42(1):113-9.

Ruttens D, Verleden SE, Bijmans EM, Winckelmans E, Gottlieb J, Warnecke G, Meloni F, Morosini M, Van Der Bij W, Verschuuren EA, Sommerwerck U, Weinreich G, Kamler M, Roman A, Gomez-Olles S, Berastegui C, Benden C, Holm AM, Iversen M, Schultz HH, Luijk B, Oudijk EJ, Kwakkel-van Erp JM, Jaksch P, Klepetko W,

Kneidinger N, Neurohr C, Corris P, Fisher AJ, Lordan J, Meachery G, Piloni D, Vandermeulen E, Bellon H, Hoffmann B, Vienneau D, Hoek G, de Hoogh K, Nemery B, Verleden GM, Vos R, Nawrot TS, Vanaudenaerde BM. An association of particulate air pollution and traffic exposure with mortality after lung transplantation in Europe. *Eur Respir J*. 2016 Nov 11. pii: ERJ-00484-2016.[Epub ahead of print].

Vieira RP, Claudino RC, Duarte AC, Santos AB, Perini A, Faria Neto HC, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Nov 1;176(9):871-7.

Vieira RP, de Andrade VF, Duarte AC, Dos Santos AB, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Aerobic conditioning and allergic pulmonary inflammation in mice. II. Effects on lung vascular and parenchymal inflammation and remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Oct;295(4):L670-9.

Vieira RP, Toledo AC, Silva LB, Almeida FM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Santos AB, Rivero DH, Hizume DC, Lopes FD, Olivo CR, Castro-Faria-Neto HC, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Anti-inflammatory effects of aerobic exercise in mice exposed to air pollution. *Med Sci Sports Exerc*. 2012 Jul;44(7):1227-34.

Voliotis A, Karali I, Kouras A, Samara C. Fine and ultrafine particle doses in the respiratory tract from digital printing operations. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016 Nov 16. [Epub ahead of print].

Wong J, Magun BE, Wood LJ. Lunginflammationcaused by inhaled toxicants: a review. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2016 Jun 23;11:1391-401.

Zakharenko AM, Engin AB, Chernyshev VV, Chaika VV, Ugay SM, Rezaee R, Karimi G, Drozd VA, Nikitina AV, Solomennik SF, Kudryavkina OR, Xin L, Wenpeng Y, Tzatzarakis M, Tsatsakis AM, Golokhvast KS. Basophil mediated proallergicinflammationin vehicle-emitted particles exposure. Environ Res. 2017 Jan;152:308-314.

Zhang S, Li L, Gao W, Wang Y, Yao X. Interventions to reduce individual exposure of elderly individuals and children to haze: a review. J Thorac Dis. 2016 Jan;8(1):E62-8.

## Figure Legends

**Figure 1** – Initial and final time comparison between each group during treadmill physical test. \*\*  $p < 0.01$  when compared final versus initial time of Exe, PM 2.5+Exe and PM 10+Exe groups.

**Figure 2**–Lung inflammation evaluated through the bronchoalveolar lavage (BAL). For Figures 4 A –G, \*\*\* $p < 0.001$  when compared with all other groups. For Figure 4 H, \* $p < 0.05$  when compared with all other groups.

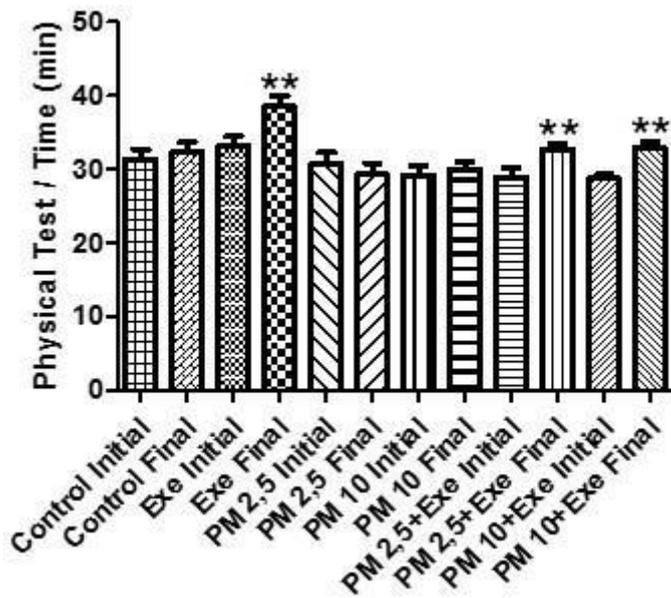
**Figure 3** – Quantitative histological analysis of lung inflammation, in the lung parenchyma and in the peribronchial space. Figure 3 A, \*\*\* $p < 0.001$  when compared with all other groups. For Figure 3 B - D, \*\* $p < 0.01$  when compared with all other groups and \* $p < 0.05$  when compared with Control and Exe groups. Figure 3 E – J are

representative photomicrographs of Control, Exe, PM 2.5, PM 10, PM 2.5+Exe and PM 10+Exe groups, respectively.

**Figure 4**—Systemic inflammation is demonstrated by the number of blood leukocytes and by the levels of IL-1 $\beta$ , CXCL1/KC, TNF- $\alpha$  and IL-10 in serum. For Figure 4 A – G, \*\*\*p<0.001 when compared with all other groups. For Figure 4 F, \*p<0.05 when compared with Control and Exe groups. For Figure 4 H, \*p<0.05 when compared with all other groups.

## Figures

**Figure 1**



**Figure 2**

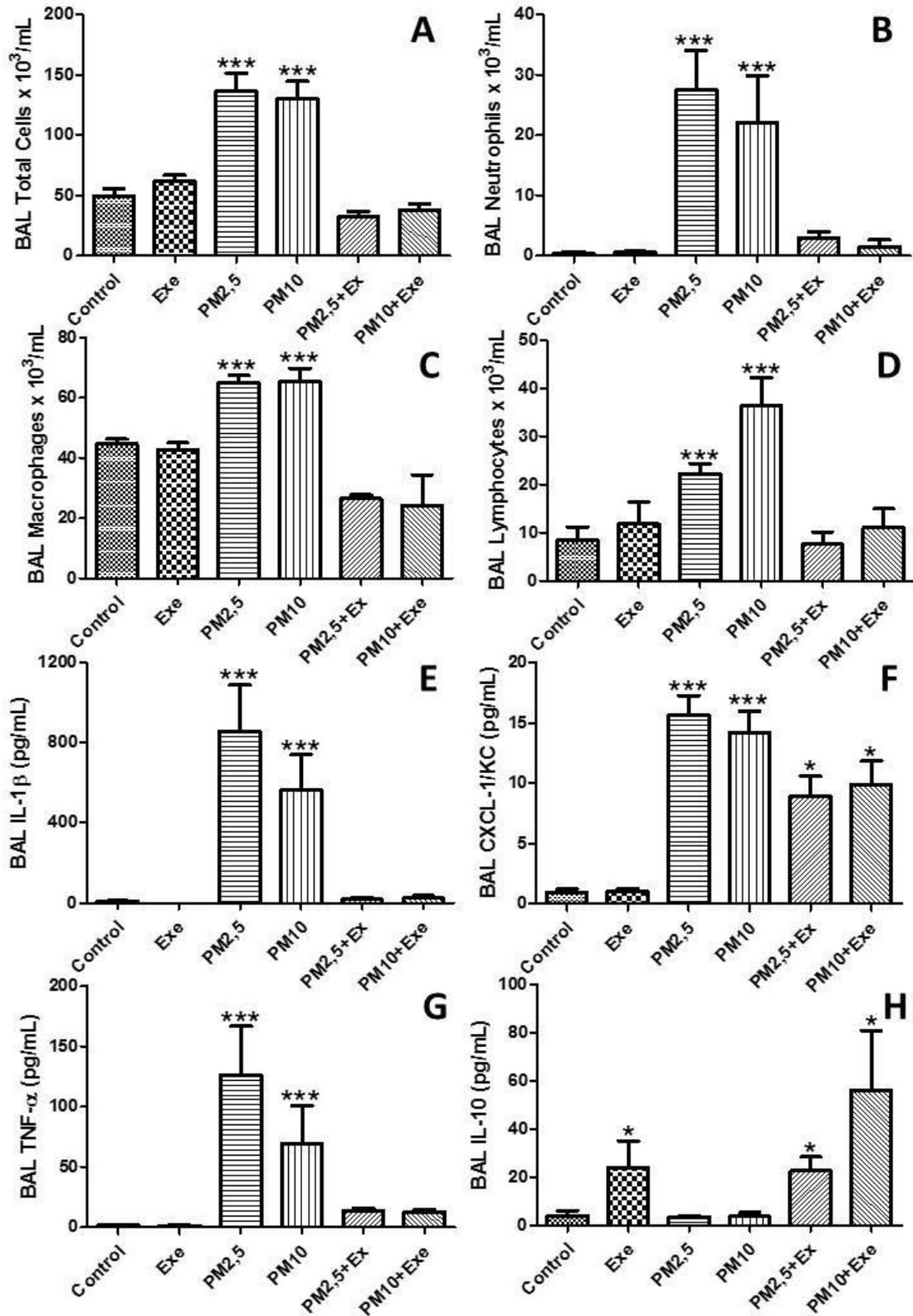


Figure 3

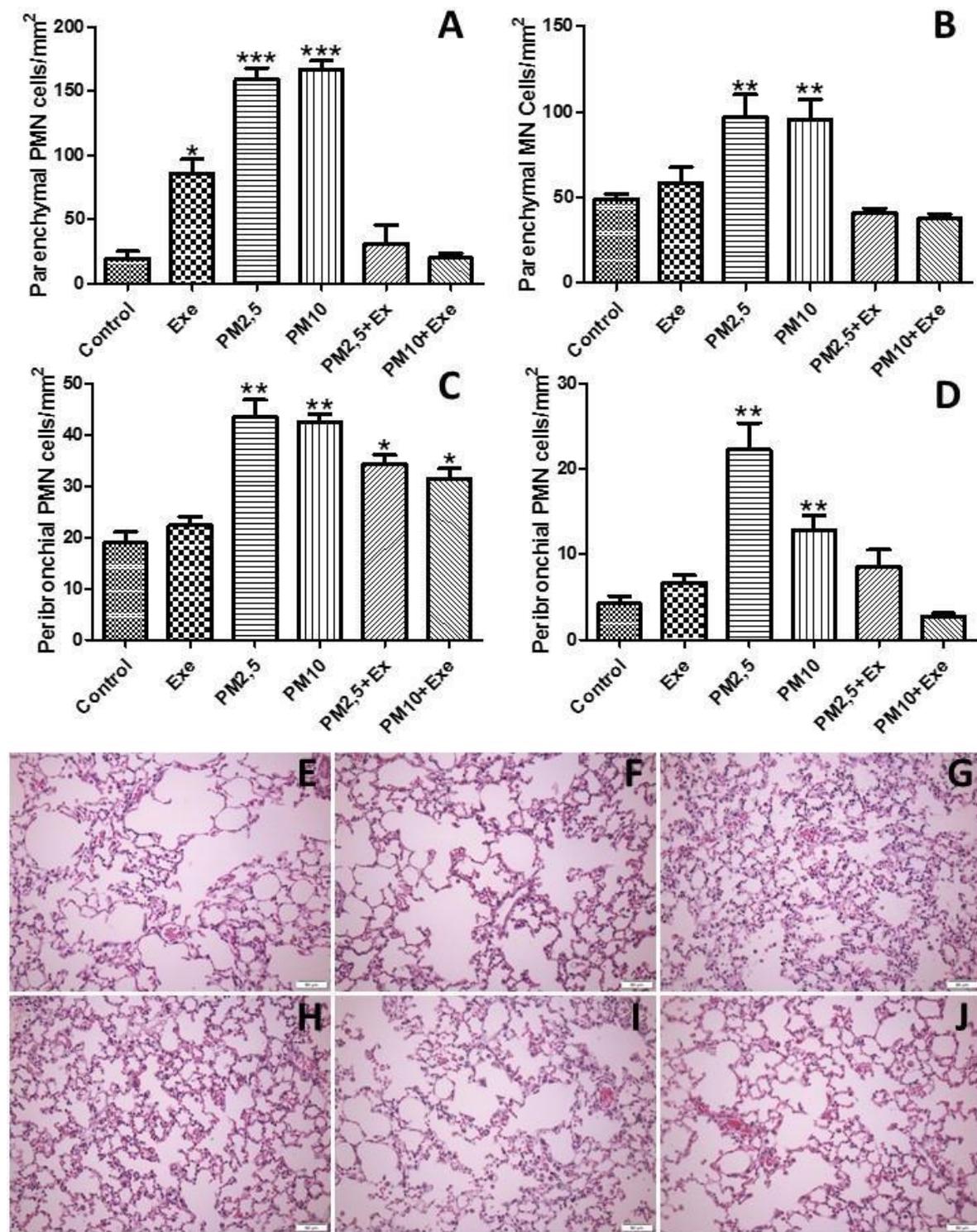


Figure 4

