

“AVALIAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO PULMONAR E DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS A PARTÍCULAS FINAS DO DIESEL”

Castro, Thamyres B^{b,e}; Riane, Alyne^{a,f}; Regonha, Tuane N^{b,e}; Delesposte, Luciano^{a,e}; Rivero, Dolores HRF^{a,g}; Vieira, Rodolfo P^{c,g}; Saraiva-Romanholo, Beatriz M^{a,b,g}; Lopes, Fernanda DTQS^{a,g}; Martins, Milton A^{a,g}; Prado, Carla M^{a,d,g}; Olivo, Clarice R^{a,b,g}

(a) Department of Medicine, University of Sao Paulo, Brazil; (b) Department of Medicine, University City of São Paulo (UNICID);(c) Brazil University;(d) Bioscience Department, UNIFESP-Campus Baixada Santista; (e) graduando; (f) pos-graduando; (g) doutor.

Resumo:

O objetivo deste trabalho foi avaliar a mecânica respiratória e o perfil inflamatório pulmonar de camundongos submetidos ao treinamento físico aeróbio (TFA) e expostos a partículas finas de diesel (PFD). 40 Camundongos BALB/C machos divididos 4 grupos: **controle**; **treino**; **poluição**; **treino+poluição**. Os animais foram submetidos ao TFA (4semanas). Após, os animais também foram expostos PFD (6semanas). Após 72h do final do protocolo, avaliamos a hiperresponsividade brônquica e lavado broncoalveolar. Encontramos aumento do número de células, macrófagos, neutrófilos e linfócitos no lavado broncoalveolar ($p<0.05$) nos animais expostos a PFD. O TFA reduziu os parâmetros inflamatórios no grupo Treino+poluição. Na hiperresponsividade brônquica, há um aumento da resistência nos animais submetidos ao TFA comparado aos demais grupos, enquanto que na avaliação da elastância, há diminuição nos grupos expostos PFD comparado aos não expostos. O TFA prévio a exposição a PFD mostrou-se efetivo em reduzir a inflamação pulmonar embora não prevenido a piora da mecânica respiratória.

Autorização legal: Este trabalho foi realizado em colaboração com a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) – Laboratório de Investigação Médica-20. E foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso dos Animais da Faculdade de Medicina da USP (nº do processo: 099/15)

Palavras-chave: poluição; exercício físico; treinamento aeróbio.

Apoio financeiro: LIM-20 - FMUSP

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UNICID

Introdução.

Um dos maiores problemas da saúde mundial é a poluição atmosférica [1], que nada mais é que a alteração das características físicas, químicas ou biológicas normais da atmosfera, de forma a causar danos aos seres vivos. A Organização Mundial da Saúde, estimou que em 2012 cerca de 7 milhões de mortes no mundo, ou seja, 1 em cada 8, puderam ser atribuídas a poluição atmosférica. Lembrando que esta estimativa é aproximadamente duas vezes maior que anterior, confirmando, mais uma vez, seus efeitos prejudiciais à saúde [2].

Por outro lado, nos últimos anos, o exercício físico tem se tornado objeto de estudo em vários modelos experimentais e clínicos do nosso grupo de pesquisa. Demonstramos nesses estudos que o exercício físico regular parece ter um efeito protetor contra várias doenças inflamatórias pulmonares. Vieira et al 2007 , 2011.[3, 4], Silva RP et al.[5, 6], Silva AC et al. [7] e Olivo et al.[8], demonstraram que a atividade física atenuou o processo inflamatório em modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica, tanto em camundongos como em cobaias. Corroborando estes dados, Mendes et al. [9-11] ressaltaram os efeitos positivos do exercício quando realizados por pacientes asmáticos. Toledo et al[12], observaram que a atividade física teve um papel atenuador das alterações pulmonares induzidas pela exposição de camundongos à fumaça de cigarro, assim como Olivo et al.[13] quando submeteu animais ao treinamento físico e a infecção por *Streptococcus pneumoniae*.

Ao final, sabemos que são inúmeros os benefícios que o exercício físico pode trazer ao indivíduo que o pratica e que o sedentarismo está ligado ao aparecimento de uma série de doenças. Assim, acreditamos que mesmo em um ambiente com maior concentração de poluentes, os indivíduos fisicamente ativos apresentem algum tipo de benefício no sistema respiratório comparado àqueles sedentários.

Considerando as evidências de que a exposição a poluição atmosférica tenha efeitos desfavoráveis no sistema respiratório e que o exercício físico possa melhorar de alguma forma o sistema imune dos indivíduos, o objetivo deste projeto foi de avaliar se o treinamento físico aeróbio poderia atenuar, em um modelo experimental, o processo inflamatório induzido pela exposição a partículas finas de diesel.

Metodologia:

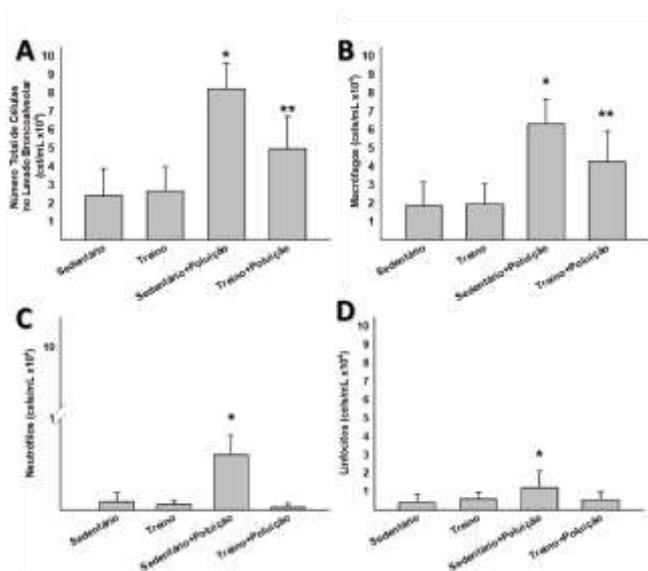
Os ensaios biológicos foram realizados no gerador de partículas de exaustão de combustíveis da Faculdade de Medicina da USP. **Delineamento Experimental:** Foram utilizados 40 camundongos Balb/c: divididos aleatoriamente em 04 grupos: **Grupo Controle:** animais que permaneceram sedentários e que não foram expostos a partículas finas do diesel; **Grupo Treino:** animais submetidos a um protocolo de treinamento físico aeróbio (TFA) e que não foram expostos a partículas finas do diesel; **Grupo Poluição:** animais sedentários expostos a partículas finas do diesel; **Grupo Treino + Poluição:** animais submetidos a um protocolo de TFA e

que foram expostos a partículas finas do diesel. **Protocolo de Treinamento Físico Aeróbio (TFA):** Esse protocolo foi realizado em esteira ergométrica adaptada para camundongos (Imbramed®), por 04 semanas. Na semana anterior ao início do TFA, os animais foram submetidos a 03 dias de adaptação na esteira ergométrica. Após, os animais foram submetidos a um teste de esforço. A intensidade do treinamento foi de 50% da velocidade atingida nesse teste. O treinamento foi realizado 5x/semana, 60min, 4 semanas. Após este período, os animais Treino+Poluição iniciaram o protocolo de exposição a partículas finas do diesel e continuaram sendo submetidos ao TFA até o final do período das exposições [3, 8]. **Protocolo de Exposição a Partículas Finas do Diesel:** Os gases resultantes do processo de queima ocorrido no gerador portátil estacionário de energia a diesel (BD-2500 CFE, Branco, China) foram conduzidos até um BAG para armazenamento das partículas e gases. Esse material diluído em ar filtrado, foi direcionado para a câmara de inalação, onde os animais foram acomodados de maneira a proceder à exposição via inalação deste material. Durante o período de exposição (60min). As exposições dos animais ocorreram 5 x/semana, por 1 h, totalizando 30 exposições. **Avaliação da hiperresponsividade brônquica:** Após 72 horas da última sessão de TFA e exposição a partículas finas do diesel, os animais foram anestesiados, traqueostomizados e conectados a um ventilador mecânico (Harvard 683) e pletismógrafo de acrílico para camundongos. Transdutores de pressão e volume transmitiram os dados de pressão traqueal, fluxo e volume a um computador. Após a estabilização, os animais receberam doses inalatórias de concentrações crescentes de metacolina (3-300mg/kg). As medidas de mecânica pulmonar foram coletadas após 30 s, 1, 2 e 3 min da administração desta.[14] **Lavado Broncoalveolar (BAL):** Após a avaliação da mecânica respiratória os animais foram eutanaziados, os pulmões foram lavados com 1,5 mL de PBS. O fluido do BAL foi centrifugado a 1000 RPM por 10 min 5°C. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o botão celular ressuspenso em HBSS+0,1%BSA para contagem das células em câmara de Neubauer. Aliquotas da suspensão celular foram centrifugadas em lâminas de vidro usando uma citocentrífuga e coradas com Giemsa. A contagem de 300 células foi feita em campos aleatoriamente selecionados. Para obtenção do número absoluto de cada população celular no BAL, as porcentagens foram multiplicadas pelo número total de células encontradas no volume[3,4,13,14]. **Análise Estatística:** Os resultados obtidos foram comparados entre-grupos utilizando a análise de variância pelo Sigma Stat 2.0 e foram considerados como estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão:

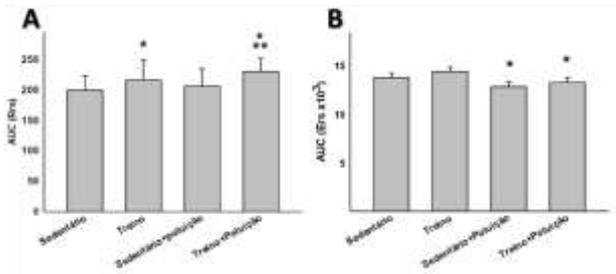
Avaliação do Lavado Broncoalveolar (BAL): Na avaliação do lavado broncoalveolar, encontramos um aumento no número total de células inflamatórias: (Figura 1A) ($*p < 0,001$), macrófagos (Figura 1B) ($*p < 0,001$), neutrófilos (Figura 1C) ($*p < 0,05$) e linfócitos (Figura 1D) ($*p < 0,05$) no grupo que permaneceu sedentário e foi exposto a poluição quando comparado aos demais grupos. Além disso, nossos resultados demonstraram que o treinamento físico conseguiu prevenir o aumento dessas células no grupo Treino+poluição (Figura 1A e 1B; $**p < 0,05$), quando comparado aos demais grupos. **Avaliação da Hiperresponsividade Brônquica a Metacolina:** Nossos resultados sugerem um aumento da resistência do sistema respiratório nos grupos submetidos ao treinamento físico comparado aos grupos que permaneceram sedentários (Figura 2A) ($*p < 0,05$). Ainda assim, os animais do grupo Treino+poluição apresentaram um aumento da resistência quando comparado ao grupo de animais Treinamento (Figura 2A) ($**p < 0,05$). Na avaliação da elastância do sistema respiratório, nossos resultados sugerem uma diminuição da elastância do sistema respiratório nos grupos expostos a partículas finas do diesel comparado aos grupos não expostos (Figura 2B) ($*p < 0,05$).

Figura1



Legenda: Lavado Broncoalveolar (BAL): (A) Número Total de Células; (B) Contagem de macrófagos ($*p < 0,001$ quando comparado aos demais grupos); (C) contagem de Neutrófilos; (D) Contagem de Linfócitos.

Figura 2



Legenda: Avaliação da Hiperrresponsividade Brônquica a Metacolina – (A) Resistência do Sistema Respiratório; (B) Elastância do Sistema Respiratório. AUC (área abaixo da curva). (* $p < 0.05$) (** $p < 0.05$).

Nossos resultados sugerem que o treinamento físico regular previne o aumento do número de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos e linfócitos, no lavado broncoalveolar. Na análise da hiperrresponsividade brônquica a metacolina, encontramos um aumento da resistência do sistema respiratório nos animais submetidos ao treinamento físico enquanto que os animais expostos a partículas finas do diesel apresentaram diminuição da elastância do sistema pulmonar. Tais resultados sugerem que muito embora o treinamento físico regular previna o aumento dos processos inflamatórios no pulmão, este não parece prevenir uma piora da mecânica pulmonar.

Estudos têm demonstrado que a exposição às emissões do tráfego também está associado a piora na condição pulmonar em pacientes com doenças como bronquite aguda [15] e crônica [16], DPOC [15] e asma [17, 18], entre outras [19]. Lopes et al [20], sugeriram, em seu estudo, que a exposição a MP a níveis ambientais urbanos pode piorar a progressão do enfisema. Posteriormente, Yoshizaki et al [21], encontrou que a exposição crônica ao DEP em animais saudáveis, mesmo em baixas doses, induziu ao alargamento dos espaços aéreos distais, sugerindo que a poluição *per se* pode alterar a estrutura pulmonar. Além disso, Schikowski et al [22] sugeriram em seu estudo que a exposição prolongada a MP_{10} em pessoas que vivem perto de rodovias com grande tráfego tem chances aumentadas de desenvolver DPOC e acelerar a perda da função pulmonar.

Já Arantes-Costa [23], demonstrou uma piora na inflamação alérgica crônica em camundongos quando expostos ao resíduo da queima de óleo diesel (ROFA) com aumento da responsividade pulmonar e diminuição do número de células ciliadas no epitélio das vias aéreas. Assim como Goldsmith et al [24], que também encontrou uma piora na hiperrresponsividade das vias aéreas à metacolina em animais com asma induzida e expostos a ROFA. Assim, nossos resultados iniciais parecem corroborar com aqueles encontrados na bibliografia uma vez que estes sugerem uma piora da resposta inflamatória no lavado broncoalveolar e uma piora na mecânica respiratória.

Por outro lado, já se tem sugerido que o exercício físico possa ter um efeito antiinflamatório em algumas doenças pulmonares como Asma [3-6, 8-11], DPOC [12], infecções [13, 25] tanto em modelos experimentais como clínicos. Vieira et al. [3, 4], Silva RP et al. [10, 11], Silva AC et al. [7] e Olivo et al. [8] demonstraram que o exercício físico feito de forma regular atenuou o processo inflamatório em modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica, tanto em camundongos como em cobaias. Corroborando estes dados, Mendes et al. [8, 10, 11] ressaltaram os efeitos positivos do exercício quando realizados por pacientes asmáticos. Toledo et al [12], observaram que a atividade física teve um papel atenuador das alterações pulmonares induzidas pela exposição de camundongos à fumaça de cigarro, assim como Olivo et al. [13] quando submeteu animais ao treinamento físico e a infecção por *Streptococcus pneumoniae*. Nossos resultados iniciais estão em concordância com o encontrado na literatura uma vez que aqueles animais submetidos ao treinamento físico regular previamente a exposição a partículas finas do diesel apresentam uma diminuição do número de células inflamatórias no lavado broncoalveolar. Muito embora, o treinamento físico não pareça prevenir a piora na mecânica respiratória.

O efeito inflamatório que a inalação do material oriundo da combustão do diesel é capaz de causar no sistema pulmonar, pode ser derivado do tamanho aerodinâmico das partículas, que são menores que $2,5 \mu m$ [26, 27]. Essas partículas têm a capacidade de atingir regiões mais distais do pulmão, estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos alveolares [28, 29] levando a diminuição da função pulmonar e o agravamento de doenças respiratórias como asma e bronquite. [30].

Conclusões: A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que o treinamento físico aeróbio prévio a exposição a partículas finas do diesel mostrou-se efetivo em atenuar a inflamação pulmonar porém não conseguiu prevenir a piora da mecânica respiratória.

Referências bibliográficas

1. Drumm FC, G.A., Fernandes GD, Chagas P, Sucolotti MS, Kemerich PDC. , *Poluição atmosférica proveniente da queima de combustíveis derivados do petróleo em veículos automotores.* . REGET, 2014. **18**(1): p. 12.
2. Saúde., O.M.d. *OMS estima que sete milhões de mortes ocorram por ano devido a contaminação atmosférica [on-line].* 2014.
3. Vieira, R.P., et al., *Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice.* Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(9): p. 871-7.

4. Vieira, R.P., et al., *Airway epithelium mediates the anti-inflammatory effects of exercise on asthma*. *Respir Physiol Neurobiol*, 2011. **175**(3): p. 383-9.
5. Silva, R.A., et al., *Airway remodeling is reversed by aerobic training in a murine model of chronic asthma*. *Scand J Med Sci Sports*, 2014.
6. Silva, R.A., et al., *Aerobic training reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model*. *Eur Respir J*, 2010. **35**(5): p. 994-1002.
7. Silva, A.C., et al., *Exercise inhibits allergic lung inflammation*. *Int J Sports Med*, 2012. **33**(5): p. 402-9.
8. Olivo, C.R., et al., *Effects of aerobic exercise on chronic allergic airway inflammation and remodeling in guinea pigs*. *Respir Physiol Neurobiol*, 2012. **182**(2-3): p. 81-7.
9. Mendes, F.A., et al., *Effects of aerobic training on airway inflammation in asthmatic patients*. *Med Sci Sports Exerc*, 2010. **43**(2): p. 197-203.
10. Mendes, F.A., et al., *Effects of aerobic training on psychosocial morbidity and symptoms in patients with asthma: a randomized clinical trial*. *Chest*, 2010. **138**(2): p. 331-7.
11. Mendes, F.A., et al., *Association between maximal aerobic capacity and psychosocial factors in adults with moderate-to-severe asthma*. *J Asthma*, 2013. **50**(6): p. 595-9.
12. Toledo, A.C., et al., *Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke*. *Eur Respir J*, 2012. **39**(2): p. 254-64.
13. Olivo, C.R., et al., *Aerobic exercise attenuates pulmonary inflammation induced by Streptococcus pneumoniae*. *J Appl Physiol (1985)*, 2014. **117**(9): p. 998-1007.
14. Muniz, B.P., et al., *Tolerogenic microenvironment in neonatal period induced by maternal immunization with ovalbumin*. *Immunobiology*, 2014. **219**(5): p. 377-84.
15. Lindgren, A., et al., *Traffic-related air pollution associated with prevalence of asthma and COPD/chronic bronchitis. A cross-sectional study in Southern Sweden*. *Int J Health Geogr*, 2009. **8**: p. 2.
16. Sunyer, J., et al., *Chronic bronchitis and urban air pollution in an international study*. *Occup Environ Med*, 2006. **63**(12): p. 836-43.
17. Chang, J., et al., *Repeated respiratory hospital encounters among children with asthma and residential proximity to traffic*. *Occup Environ Med*, 2009. **66**(2): p. 90-8.
18. Margolis, H.G., et al., *Altered pulmonary function in children with asthma associated with highway traffic near residence*. *Int J Environ Health Res*, 2009. **19**(2): p. 139-55.
19. Manzo, N.D., et al., *Nitric oxide and superoxide mediate diesel particle effects in cytokine-treated mice and murine lung epithelial cells--implications for susceptibility to traffic-related air pollution*. *Part Fibre Toxicol*, 2012. **9**: p. 43.
20. Lopes, F.D., et al., *Exposure to ambient levels of particles emitted by traffic worsens emphysema in mice*. *Environ Res*, 2009. **109**(5): p. 544-51.
21. Yoshizaki, K., et al., *Chronic exposure of diesel exhaust particles induces alveolar enlargement in mice*. *Respir Res*, 2015. **16**(1): p. 18.
22. Schikowski, T., et al., *Long-term air pollution exposure and living close to busy roads are associated with COPD in women*. *Respir Res*, 2005. **6**: p. 152.
23. Arantes-Costa, F.M., et al., *Effects of residual oil fly ash (ROFA) in mice with chronic allergic pulmonary inflammation*. *Toxicol Pathol*, 2008. **36**(5): p. 680-6.
24. Goldsmith, C.A., et al., *Effects of environmental aerosols on airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma*. *Inhal Toxicol*, 1999. **11**(11): p. 981-98.
25. Reis Goncalves, C.T., et al., *Protective effects of aerobic exercise on acute lung injury induced by LPS in mice*. *Crit Care*, 2012. **16**(5): p. R199.
26. Anselme, F., et al., *Inhalation of diluted diesel engine emission impacts heart rate variability and arrhythmia occurrence in a rat model of chronic ischemic heart failure*. *Arch Toxicol*, 2007. **81**(4): p. 299-307.
27. Gottipolu, R.R., et al., *One-month diesel exhaust inhalation produces hypertensive gene expression pattern in healthy rats*. *Environ Health Perspect*, 2009. **117**(1): p. 38-46.
28. Bayram, H., et al., *The effect of diesel exhaust particles on cell function and release of inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998. **18**(3): p. 441-8.
29. Nemmar, A., et al., *Air pollution and thrombosis: an experimental approach*. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2002. **32**(5-6): p. 349-50.
30. Sydbom, A., et al., *Health effects of diesel exhaust emissions*. *Eur Respir J*, 2001. **17**(4): p. 733-46.