INFLUENCIA DE PARTÍCULAS DE LOS MOTORES DIÉSEL ASÍ COMO DE CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS EN LA LESIÓN CEREBRAL Y REPARACIÓN TRAS ICTUS EXPERIMENTAL

Dra. Anna Rosell Novel
Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron - VHIR

1. Resumen

La contaminación del aire en las ciudades está formada por partículas (PM), gases, compuestos orgánicos y metales. Sin embargo, se considera que la fracción de partículas de la combustión artificial de combustibles fósiles, es decir, las partículas de escape diésel (DEP), es la más dañina para la salud humana. A medida que la partícula se hace menor, más puede penetrar en los órganos y más acciones perjudiciales puede infligir. Además, la contaminación del aire se clasifica como un importante factor de riesgo para la mortalidad y los datos recientes indican que la mortalidad global y la morbilidad de las enfermedades cardiovasculares están fuertemente influenciadas por las acciones perjudiciales por PM. Entre las enfermedades cardiovasculares, el ictus es la segunda causa de muerte a escala mundial y el 85% de los ictus están causados por la oclusión de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro. En este contexto, se cree que la PM contribuye a la patología del ictus isquémico mediante mecanismos de inflamación, protrombosis y/o recuperación deteriorada.

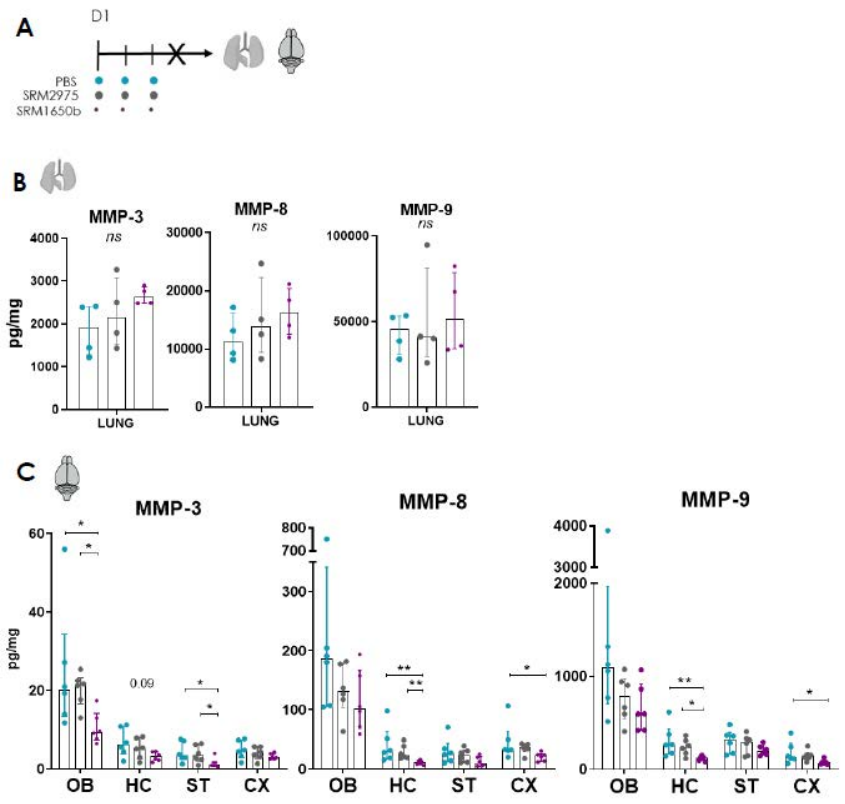
Este proyecto pretende investigar la posible interacción de la DEP en el cerebro con los mecanismos fisiopatológicos de la isquemia cerebral antes y durante la fase aguda de la enfermedad, mediante modelos experimentales que incluyen un modelo de ratón de isquemia cerebral *in vivo*, mediante células madre neurales (NSC) *in vitro* y mediante un ensayo turbidimétrico *ex vivo* de formación de coágulos y lisis inducida por tPA con muestras de plasma de humanos y ratones. Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son enzimas clave relacionadas con lesiones e inflamaciones en el ictus agudo, pero también son esenciales en la remodelación del tejido postictus. En los pulmones de ratones sanos expuestos a DEP durante 3 días (agudo) o 3 semanas (crónico), los niveles de MMP no se alteraron. Sin embargo, en el cerebro disminuyeron después de la exposición aguda a DEP, pero aumentaron después de la exposición crónica. La exposición crónica redujo las cantidades de neuronas corticales, mientras que ambas exposiciones mostraron menos NSC en el flujo migratorio rostral que coinciden con los datos *in vitro* en los que la viabilidad de las NSC estaba en peligro. Tras una exposición aguda o crónica a DEP, los ratones sufrieron una oclusión permanente de la arteria cerebral media (MCAo, isquemia). En los pulmones del grupo expuesto crónicamente, se observó una respuesta MMP alterada junto con macrófagos alveolares reducidos y aumento de los macrófagos y monocitos intersticiales. Sin embargo, la lesión cerebral producida por la isquemia cerebral no se agravó por la preexposición a DEP, y no se

observaron cambios en los niveles de MMP cerebrales ni en el recuento de células de distintas células del SNC. Se estudiaron los posibles efectos sistémicos de la exposición a DEP relacionados con el ictus analizando las características plasmáticas trombogénicas/trombolíticas mediante turbidimetría. Tras la isquemia, el plasma de ratón y humano presentó características protrombogénicas en presencia de DEP, mientras que la trombólisis se ralentizó en el grupo crónico isquémico y volvió a los niveles basales después de la exposición a DEP. Además, el plasma de personas que vivían en zonas altamente contaminadas presentaba una trombólisis acelerada frente a los individuos que vivían en zonas menos contaminadas.

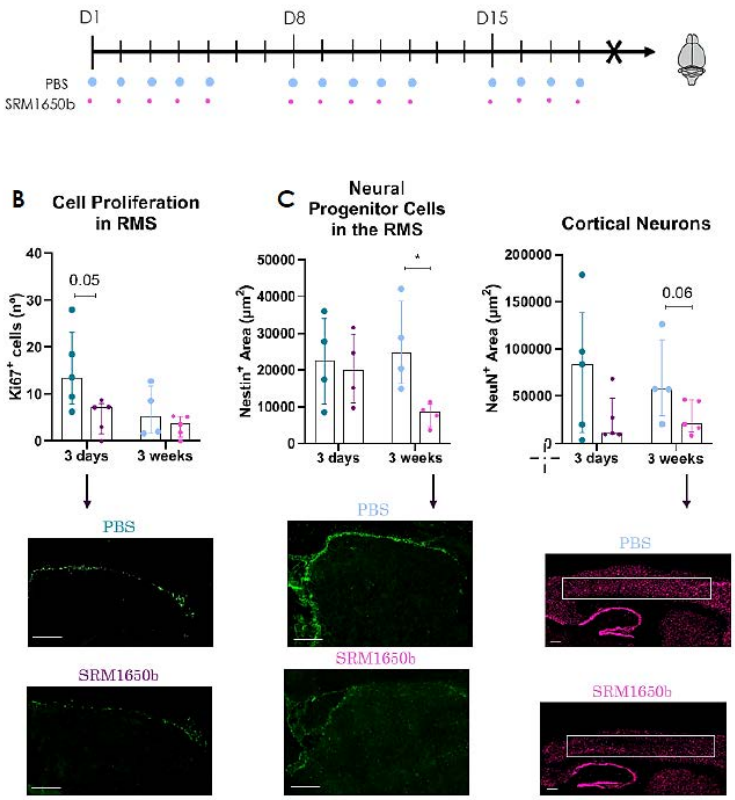
En conclusión, hemos descubierto que las partículas de escape del diésel pueden regular la expresión de proteasas cerebrales en animales sanos, a la vez que reducen los grupos de células neurales progenitoras y neuronas maduras, lo cual pone en peligro el equilibrio fisiológico del SNC. El papel perjudicial esperado de la exposición a DEP en el contexto de la isquemia cerebral mediante la exacerbación de la lesión de infarto no se ha observado en las condiciones probadas, aunque es necesario dilucidar la influencia en la reparación postictus. Sistémicamente, la exposición a DEP influyó en el reclutamiento de poblaciones de leucocitos inflamatorios en los pulmones después de la isquemia e indujo características protrombóticas en el plasma que podrían influir en los coágulos cerebrales en la enfermedad de ictus y el resultado de las terapias trombolíticas, que hoy en día son el único tratamiento para el ictus isquémico en la fase aguda de la enfermedad.

2. Resultados

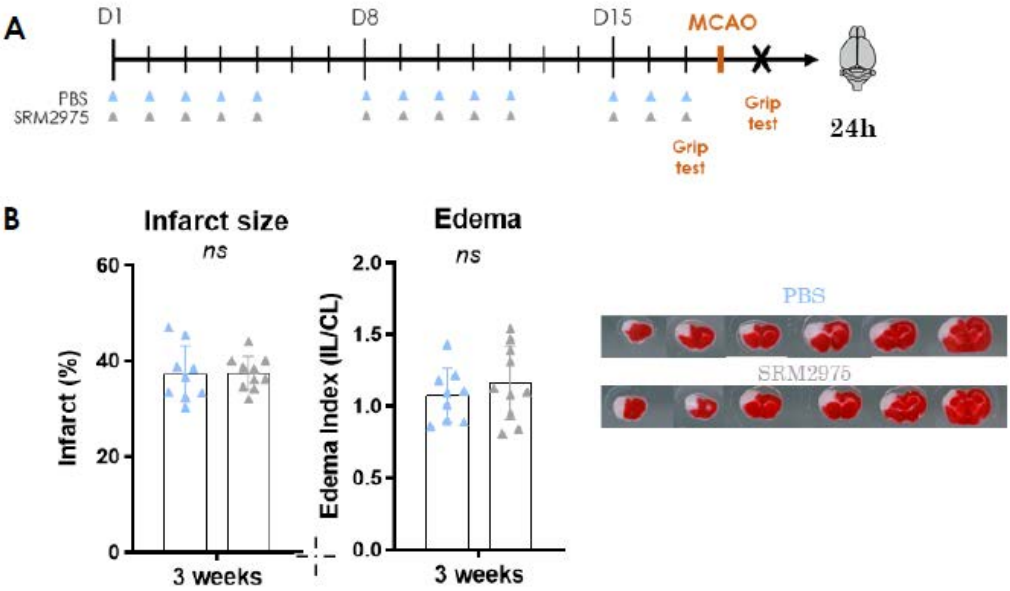
1-La exposición aguda a SRM1650b DEP disminuye los niveles de MMP en el cerebro de ratones naífs. A: Diseño experimental: después de 3 días de exposición, se obtuvieron cerebros y pulmones para el análisis de MMP. B: Niveles de MMP-3, -8 y -9 en los pulmones. C: Las MMP se analizaron en distintas regiones del cerebro y se observaron niveles de MMP disminuidos en varias de estas áreas. Los datos se representan como mediana (IQR). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, PBS(n=6), SRM2975(n=6) o SRM1650b(n=6).



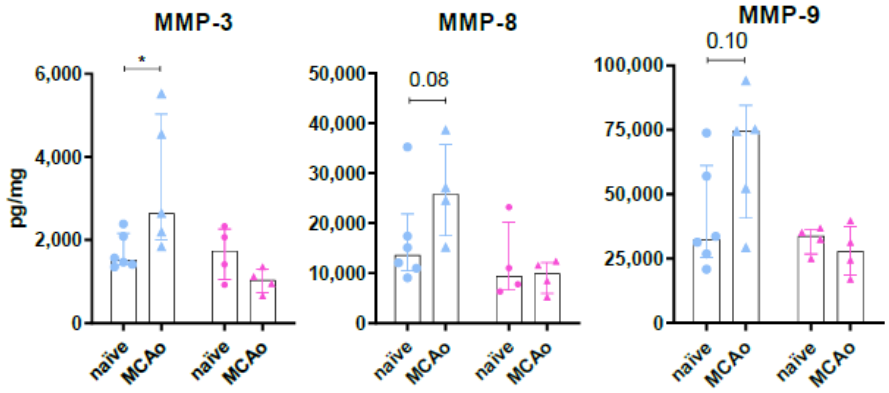
2-Los marcadores de neurogénesis cerebral se redujeron después de la exposición a SRM1650b en ratones naífs. A: Diseño experimental: exposición a DEP de 3 días y 3 semanas antes del estudio de inmunofluorescencia en el cerebro. B: Gráficos de barras e imágenes representativas que muestran la reducción de Ki-67+ en ratones expuestos de forma aguda. C: Gráficos de barras e imágenes representativas de inmunofluorescencia del estudio Nestin+ y NeuN+ que muestran un área positiva reducida en ratones expuestos crónicamente. Los datos se representan como mediana (IQR). Escala: 200 µm. Se realizan comparaciones entre DEP y PBS. * $p<0,05$. PBS agudo(n=5), SRM1650b(n=5) y PBS crónico(n=4), SRM1650b(n=5).



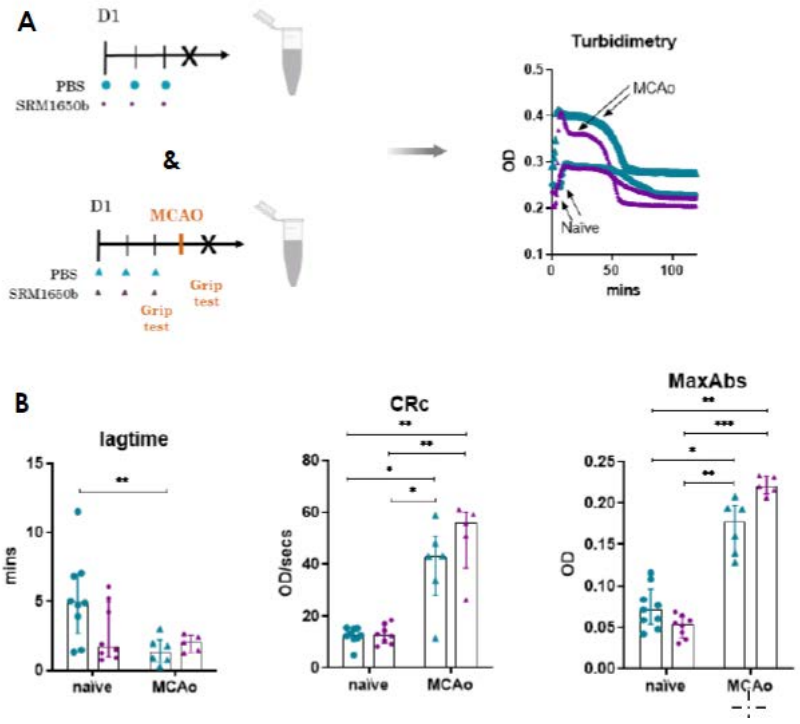
3-Medidas de lesiones de infarto después de una exposición crónica a DEP a las 24 horas de isquemia permanente. A: Visión general del diseño experimental. B: Gráficos de barras que muestran las cuantificaciones de infarto y edema e imágenes representativas del TTC. Los datos se representan como promedio ± SD. ns: no significativo. PBS(n=9), SRM2975(n=10).



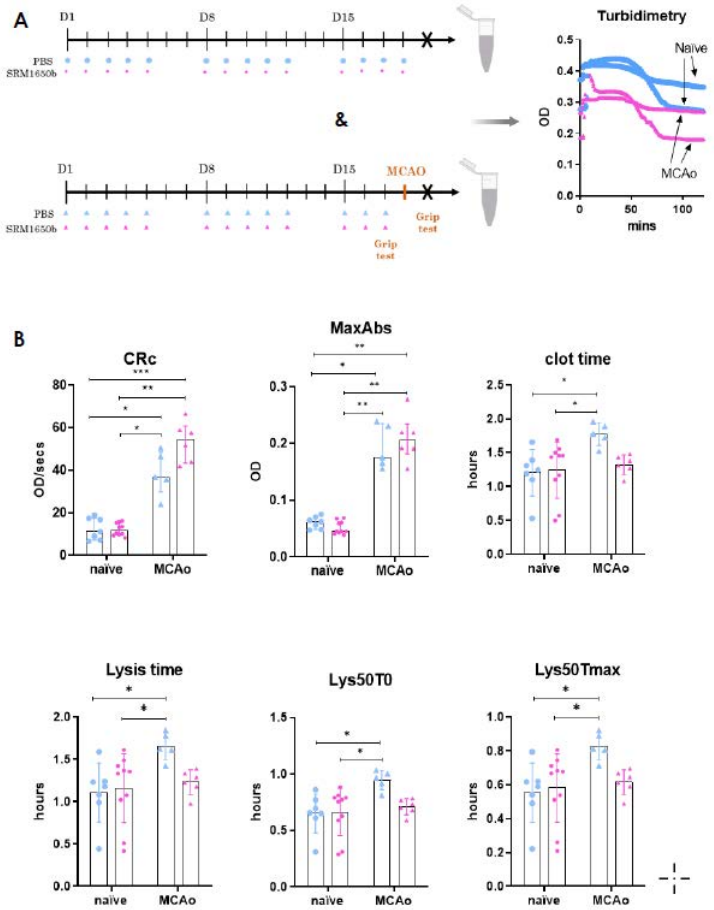
4-Alteraciones de MMP en los pulmones después de la isquemia en ratones expuestos crónicamente. Existe una respuesta de MMP inflamatoria después de la isquemia en los pulmones de ratones isquémicos PBS, que no se observa después de la exposición crónica a SRM1650b. Datos representados como mediana (IQR). * p<0,05. naïve: PBS(n=6), SRM1650b(n=4) y MCAo-PBS(n=5), SRM1650b(n=5).



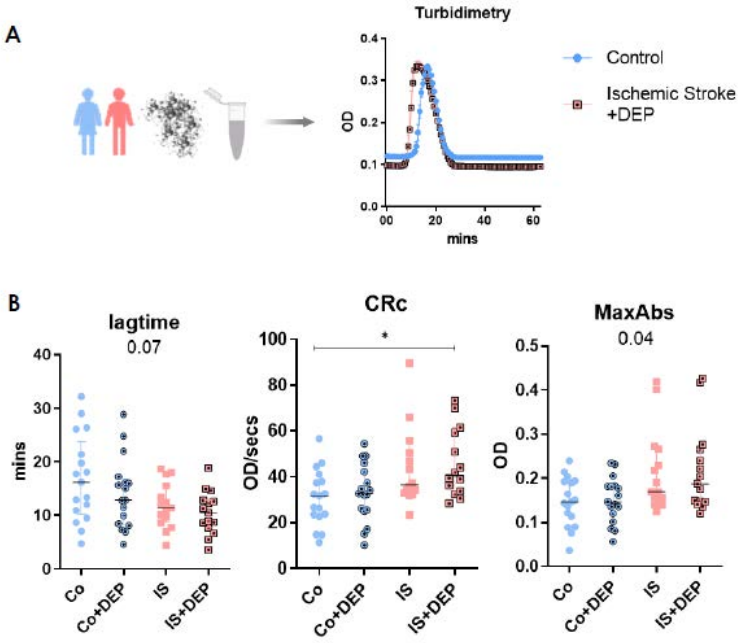
5-Estudio de turbidimetría de formación y lisis de coágulos en ratones naífs e isquémicos expuestos de forma aguda. A: Visión general del diseño experimental con curvas turbidimétricas representativas. B: Después de la isquemia, el tiempo de retraso se acorta, la formación de la pendiente se acelera (CRc) y la densidad del trombo (MaxAbs) aumenta. Datos representados como mediana (IQR). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. naïve-PBS (n= 9), SRM1650b (n= 8) y MCAo-PBS (n= 6), SRM1650b (n = 5).



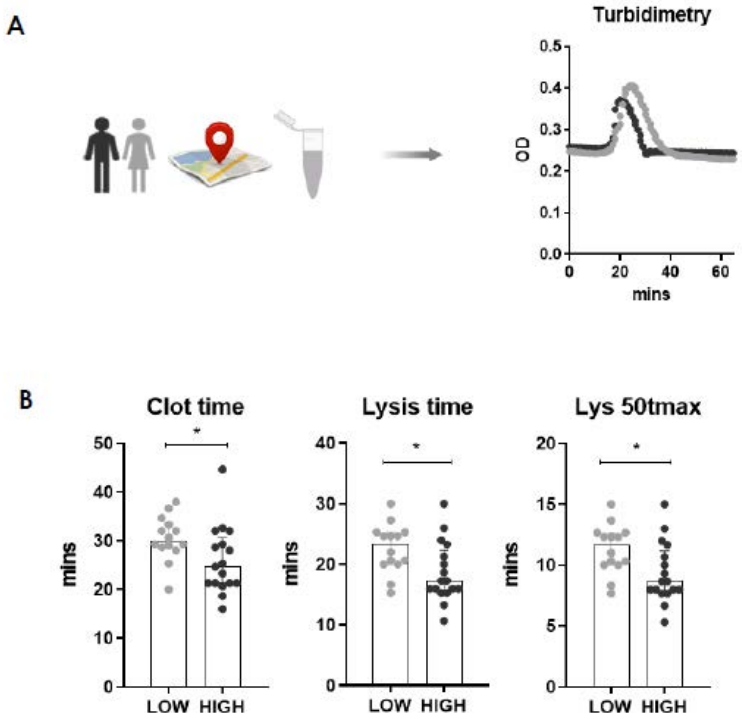
6-Formación y lisis de trombos en animales naífs y MCAo expuestos crónicamente. A: Visión general del diseño experimental. B: CRc y MaxAbs, parámetros de formación, se modifican en el grupo isquémico y se incrementan después de la exposición a DEP, mientras que los parámetros de lisis solo mostraron diferencias después de la isquemia en los ratones expuestos a DEP. Datos representados como media ± SD o media (IQR). * p<0,05, ** p<0,01. *** p<0,001. naïve-PBS (n= 7), SRM1650b (n= 9) y MCAo-PBS (n= 5), SRM1650b (n= 6).



7-Ensayo turbidimétrico en plasmas de pacientes de control e ictus isquémico. A: Visión general del diseño experimental y curvas turbidimétricas representativas. B: Se observaron tiempos de latencia reducidos (*lag time*), aumento de las tasas de formación de coágulos (CRc) y absorbancias máximas en coágulos de pacientes con IS cuyo plasma estuvo expuesto a DEP durante el ensayo. Esta diferencia se convirtió en significativa en la tasa de formación de coágulos al comparar el plasma no expuesto de los controles. Datos representados como mediana (IQR). * $p<0,05$. Co: Control, IS: ictus isquémico.



8-La lisis del coágulo es más rápida en el grupo muy expuesto a PM2,5. A: Visión general del diseño experimental y curvas turbidimétricas representativas. B: Barras gráficas que muestran un tiempo de coagulación reducido, un tiempo de lisis y una lisis 50 Tmax en el grupo altamente expuesto en comparación con el menos expuesto. Datos representados como mediana (IQR). *p<0,05.



3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Los resultados demuestran los riesgos para la salud de la exposición a contaminantes del aire como las partículas de escape diésel en entornos urbanos o industriales, que podrían disminuir el potencial neurogénico fisiológico del cerebro en individuos sanos y en enfermedades específicas como el ictus, en el que la exposición a niveles elevados de partículas diésel podría influir en la coagulación de la sangre y la respuesta a los fármacos trombolíticos. En general, este estudio experimental posiciona a los contaminantes atmosféricos como las partículas de escape diésel como factores de riesgo ambiental para la salud humana que afectan directamente al cerebro con un impacto potencial en pacientes con ictus.

4. Bibliografía científica generada

Tesis doctorales

"Brain, lung and plasma alterations induced by diesel exhaust particle exposure in the context of ischemic stroke". Universidad y programa de doctorado: UAB, Neurociencias. Fecha de defensa de tesis doctoral: 1 de marzo de 2022. Autor: Mercedes Arrúe Gonzalo.

Publicaciones

Plasma exposed to diesel exhaust particles exacerbates the pro-thrombotic characteristics after cerebral ischemia and accelerates tPA-induced thrombolysis. (En preparación).

Neural progenitors are decreased after diesel exhaust particle (DEP) exposure in the mouse brain. (En preparación).

Physical characterization of the diesel exhaust particle materials SRM2975 and SRM1650b representative of two different combustion engines to obtain smaller sized fractions. (En preparación).

Comunicaciones

Arrúe-Gonzalo M, Penalba A, Pizarro J, Turner M, De Homdedeu M, Cruz MJ, Delgado P, Rosell A. "Acute exposure to diesel exhaust particles before cerebral ischemia induces pro-thrombogenic plasma changes while chronic exposure can impair the physiological response". 7th European Stroke Organisation Conference (ESOC). 1-3 de septiembre de 2021. Tipo de comunicación: presentación de póster.

Arrúe-Gonzalo M, Rodríguez-Bodero A, Esquiva G, Penalba A, Simats A, De Homdedeu M, Cruz MJ, Montaner J, Rosell A. "Traffic-related pollution can alter levels of matrix metalloproteinases in brain and lungs after cerebral ischemia in mice". XIII Vall d'Hebron Research Institute Scientific Meeting. Cataluña. Diciembre de 2019. Tipo de comunicación: presentación de póster.

Arrúe-Gonzalo M, Rodríguez-Bodero A, Esquiva G, Penalba A, Simats A, De Homdedeu M, Cruz MJ, Montaner J, Rosell A. "Traffic-related pollution can alter levels of matrix metallopreoteinases in brain and lungs after cerebral ischemia in mice". VII Neuroscience Institute Conferences. Cataluña. Octubre de 2019. Tipo de comunicación: presentación oral.

Arrúe-Gonzalo M, Rodríguez-Bodero A, Esquiva G, Penalba A, Simats A, De Homdedeu M, Cruz MJ, Montaner J, Rosell A. "Traffic related pollution reduces the levels of matrix metalloproteinases in hippocampus and striatum after cerebral ischemia in mice". V European Stroke Organisation Conference. Milán. Mayo de 2019. Tipo de comunicación: presentación de póster.