

UNIVERSIDADE BRASIL

INSTITUTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DE SÃO PAULO

DEPARTAMENTO DE BIOENGENHARIA

HÉLIDA CRISTINA AQUINO DOS SANTOS

**ALTERAÇÃO CRÔNICA DO RITMO CIRCADIANO EM POLICIAIS MILITARES
ESTÁ RELACIONADA COM A PIORA DA FUNÇÃO PULMONAR E DA
RESPOSTA IMUNOLÓGICA**

**CHRONIC ALTERATION OF CIRCADIAN RHYTHM IN POLICEMEN IS RELATED
TO IMPAIRED LUNG FUNCTION AND IMMUNE RESPONSE**

São Paulo, SP

2019

HÉLIDA CRISTINA AQUINO DOS SANTOS

**ALTERAÇÃO CRÔNICA DO RITMO CIRCADIANO EM POLICIAIS MILITARES
ESTÁ RELACIONADA COM A PIORA DA FUNÇÃO PULMONAR E DA
RESPOSTA IMUNOLÓGICA**

CHRONIC ALTERATION OF CIRCADIAN RHYTHM IN POLICEMEN IS RELATED
TO IMPAIRED LUNG FUNCTION AND IMMUNE RESPONSE

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira

Artigo apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da
Universidade Brasil, como complementação de créditos necessários par à obtenção
do título de Mestre em Bioengenharia.

São Paulo

2019

SANTOS, Héli da Cristina Aquino dos

S235a Alteração crônica do ritmo circadiano em policiais militares está relacionada com a piora da função pulmonar e da resposta imunológica / Héli da Cristina Aquino dos Santos. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2019.
38 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira
Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do curso de Bioengenharia da Universidade Brasil.

1. Ritmo Circadiano. 2. Função Pulmonar. 3. Alteração da Função Pulmonar. 4. Alteração da Função Imunológica Pulmonar. 5. Alteração da Função Imunológica Sistêmica.
I. Título.


CDD 620.8

TERMO DE APROVAÇÃO


HÉLIDA CRISTINA AQUINO DOS SANTOS

**“ALTERAÇÃO CRÔNICA DO RITMO CIRCADIANO EM POLICIAIS MILITARES ESTÁ
RELACIONADA COM A PIORA DA FUNÇÃO PULMONAR E DA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre no Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:



Prof.(a) Dr.(a) Rodolfo de Paula Vieira (presidente-orientador)




Prof.(a) Dr.(a) Daniel Souza Ferreira Magalhães (UNIVERSIDADE BRASIL)



Prof.(a) Dr.(a) Regiane Albertini de Carvalho (UNIFESP)

São Paulo, 06 de setembro de 2019
Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Rodolfo de Paula Vieira



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **"ALTERAÇÃO CRÔNICA DO RITMO CIRCADIANO EM POLICIAIS MILITARES ESTÁ RELACIONADA COM A PIORA DA FUNÇÃO PULMONAR E DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA"**

Autor(es):

Discente: **Hélida Cristina Aquino dos Santos**

Assinatura: _____

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

Assinatura: _____

Coorientador(a):

Assinatura: _____

Data: 06/09/2019

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	8
2. ARTIGO	13
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

RESUMO

O ritmo circadiano são oscilações biológicas que ocorrem no período de 24 horas. Suas alterações afetam negativamente vários aspectos da saúde, incluindo a função pulmonar. A escala de turnos irregulares crônicos induz classicamente essas alterações. No entanto, seus efeitos na resposta imune pulmonar são desconhecidos. Nesse contexto, uma escala de trabalho de 12h x 24h e 12h x 48h em policiais da escala de trabalho por turnos ($n = 25$; $38,73 \pm 6,92$ anos) foi comparada com homens civis da escala de trabalho fixo e 8h / dia ($n = 25$; $34,00 \pm 9,60$ anos), foram avaliados quanto a estresse percebido, níveis de atividade física, características antropométricas, níveis de sonolência, função pulmonar, resposta imune pulmonar e sistêmica. Os resultados mostraram que os policiais apresentaram níveis reduzidos de estresse percebido ($p < 0,0008$), sonolência prejudicada ($p < 0,04$), CVF da função pulmonar (%) ($p < 0,053$) e VEF1 (%) ($p < 0,043$) prejudicadas quando comparado aos homens civis. Os níveis de citocinas no condensado da respiração IFN-gama, IL-10, IL-17 não diferiram entre os grupos ($p > 0,05$), enquanto os níveis de IL-2 foram significativamente maiores nos policiais em comparação aos homens civis ($p < 0,0046$). Além disso, os policiais apresentaram níveis aumentados de óxido nítrico exalado, um marcador de inflamação crônica do pulmão, em comparação com homens civis ($p < 0,037$). Em relação às citocinas sistêmicas, não foram encontradas diferenças para IL-17 e IFN-gama ($p > 0,05$), enquanto policiais apresentaram níveis mais altos de IL-2 ($p < 0,002$) e menores níveis de IL-10 ($p < 0,001$). Significado: A alteração crônica do ritmo circadiano nos policiais da escala de turnos resulta em comprometimento da função pulmonar, além de comprometimento da função imunológica pulmonar e sistêmica.

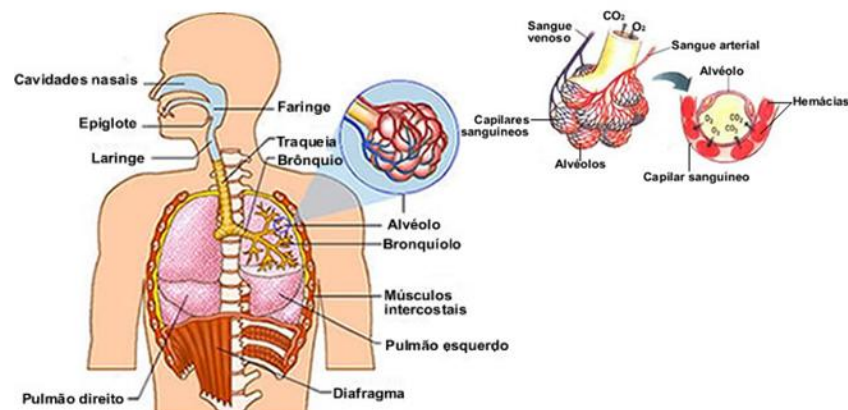
Palavras-chave: função pulmonar, imunologia pulmonar, ritmo circadiano, estresse, citocinas.

1. INTRODUÇÃO

O sistema respiratório é pode ser definido de modo geral como um sistema de vias aéreas superiores e inferiores, unido a um par de pulmões, revestidos pelas pleuras e estão contidos na caixa torácica. Divididas por quatro eventos funcionais: ventilação pulmonar, que significa a entrada e saída de ar entre a atmosfera e os alvéolos pulmonares. Por difusão de oxigênio e dióxido de carbono entre os alvéolos e o sangue. Por meio de transporte de oxigênio e dióxido de carbono no sangue e nos líquidos corporais para as células. E por fim, por meio da regulação da ventilação e outros aspectos da respiração. (3; 13).

As vias aéreas são compostas por uma série de tubos ramificados, que se tornam mais estreitos, mais curtos e mais numerosos, à medida que penetram mais profundamente no pulmão. A traqueia divide-se em brônquios principais direito e esquerdo, os quais se dividem em brônquios lobares e segmentares. Processo que continua nos bronquíolos terminais, os quais são as menores vias aéreas sem alvéolos. São denominadas como via aérea de condução, tem a função é levar o ar inspirado até as regiões de troca gasosa do pulmão, como essas vias não têm alvéolos, não participam da troca gasosa do pulmão, elas constituem o *espaço anatômico morto* do pulmão. (13).

Os bronquíolos terminais se dividem em bronquíolos respiratórios, os quais apresentem alvéolos em suas paredes, finalmente chegando a seus ductos alveolares, que são inteiramente revestidos de alvéolos. Essa é a região do pulmão onde ocorrem as trocas gasosas, conhecida como zona respiratória. (13).



O ritmo circadiano é caracterizado por oscilações biológicas que ocorrem no período de 24 horas, é responsável pelo funcionamento normal de todos os sistemas orgânicos, como sistema respiratório, pode ser influenciado por variações de luz, temperatura, tempo e qualidade do sono e diferentes tipos de estresse. (6).

As alterações no ritmo circadiano podem afetar negativamente no sistema imunológico (2; 8), assim como nas respostas endócrina, metabólica (10), cardiovascular (10) e pulmonar (12). Especificamente, na resposta pulmonar imuno regulada foi demonstrado que o ritmo circadiano causa broncoconstrição, resistência das vias aéreas, inflamação e sintomas respiratórios, que, em resumo, pode levar à exacerbação de doenças respiratórias, particularmente a doenças respiratórias crônicas, como asma. (8) e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). (7).

É fundamentado que as alterações do ritmo circadiano levam não apenas à disfunção da resposta imune pulmonar, mas também sistêmica. (2; 8; 10). Estudos demonstram que os monócitos humanos obtidos de indivíduos durante a noite, especificamente durante o período de sono, liberam quantidades aumentadas de Interleucinas (IL) IL-2 (citocina pró-inflamatória) em resposta à estimulação de endotoxina, enquanto os monócitos obtidos durante o dia respondem ao aumento liberação de IL-10 (citocina imunorreguladora e anti-inflamatória). (4; 9). Da mesma forma, estabelecendo um nexo causal, alguns estudos demonstraram que a frequência e a gravidade das exacerbações da DPOC e da asma estão aumentadas especialmente durante a noite e nas primeiras horas da manhã, que são marcas da interferência do ritmo circadiano. (7; 8).

Durante uma crise de broncoconstrição todos os índices de velocidade de fluxo expiratório encontram-se acentuadamente reduzidos, incluindo Volume Expiratório Forçado em 1 Segundo (VEF_1), Índice de Tiffeneau ($VEF/CVF\%$), Fluxo Expiratório Forçado 25-75% ($FEF_{25-75\%}$), Volume máximo Expirado 50% ($V_{max50\%}$) e Volume máximo Expirado 75% ($V_{max75\%}$). A Capacidade Vital Forçada (CVF) na maioria das vezes também está reduzida, pois as vias aéreas se fecham precocemente ao final de uma expiração forçada, as respostas nesses índices aos broncodilatadores são de grande importância, a extensão do aumento da via aérea irá variar de acordo com a gravidade da doença respiratória, esses índices são analisados através do exame de espirometria. (14).

A espirometria é considerada padrão ouro nos exames de função pulmonar, analisa a função pulmonar medindo-se o volume de ar que paciente pode expirar forçadamente após uma inspiração máxima. É um teste que auxilia na prevenção, permite o diagnóstico, quantifica a gravidade dos distúrbios ventilatórios e avalia a resposta ao tratamento. (1).

As principais informações fornecidas são:

- Pico de fluxo expiratório (PFE): reflete o calibre das grandes vias aéreas e está ligado intimamente com o esforço, podendo ser usado na espirometria para avaliação do esforço expiratório inicial adequado e para detecção de obstrução de vias aéreas centrais. (1).
- Capacidade vital forçada (CVF): É o volume total de ar que o paciente forçadamente pode expirar em uma respiração. (1).
- Volume expiratório forçado em um segundo (VEF_1): É o volume de ar que o paciente é capaz de expirar no primeiro segundo da expiração forçada.(1).
- VEF_1/CVF (Índice de Tiffeneau): Relação do VEF_1 com a CVF expressa como uma fração. (1).
- Fluxo Expiratório Forçado $_{25-75\%}$ ($FEF_{25-75\%}$): É o volume de ar exalado entre 25 e 75% da manobra de CVF. (1).
- Capacidade vital lenta (CVL): É o volume medido entre a plena inspiração e expiração completa. (1).

Na broncoconstrição, além dos índices de velocidade de fluxo expiratório reduzidos. Encontramos nas vias aéreas um músculo liso hipertrofiado que se contrai durante uma exacerbação. Também há hipertrofia das glândulas mucosas, edema da parede brônquica e infiltração por eosinófilos que leva a uma produção anormal de muco com aparência espessa, viscosa e de movimento lento. Algumas vias aéreas são ocluídas por tampões mucosos, a expectoração geralmente é escassa com coloração esbranquiçada. (11; 14).

Reações brônquicas aos alérgenos podem aparecer nas formas de respostas imediatas e tardias. O desenvolvimento de uma reação pulmonar é dependente de uma interação inicial alérgeno / IgE / mastócito. Quando prevenido com cromoglicato

de sódio evitam-se todos os eventos subsequentes. A maioria dos pacientes asmáticos com obstrução reversível das vias aéreas beneficia-se com o tratamento por corticosteroides inalados, especialmente associados à reação de fase tardia. (5).

A forma induzível da óxido nítrico-sintetase (iNOS) produz óxido nítrico (NO) em muitos tipos celulares em resposta ao estímulo por citocinas. Esta enzima recentemente foi encontrada em níveis elevados no epitélio brônquico de pacientes asmáticos e não foi encontrado em indivíduos normais. Sendo assim o óxido nítrico pode exercer um papel na patogênese da asma e que a determinação do NO exalado pode ser útil clinicamente no diagnóstico, monitoramento e controle da doença. (5).

A primeira linha de defesa do organismo contra o microorganismo patogênico é representada pela imunidade inata. Esse sistema consegue identificar estruturas estranhas ao organismo e atacá-las imediatamente após o contato. (9).

Os componentes celulares da resposta inata são compostos por macrófagos, neutrófilos, células natural killer (NK), células dendríticas, mastócitos e basófilos. Outra célula importante na função imune inata é a célula epitelial, por ser a primeira a entrar em contato com o patógeno. Além destes, outros componentes importantes que fazem parte do sistema imune inato, outros componentes solúveis que incluem moléculas do sistema de complemento, lectinas, colectinas, defensinas, lisozimas, fosfolipase A2, serprocidinas e lactoferrinas ligadas ao ferro, são importantes no reconhecimento dos patógenos. (9).

Os antígenos encontrados na parede celular de diferentes micro-organismos são chamados de padrões moleculares associados a patógeno (PMAP), são reconhecidos por receptores específicos. (9; 14).

Quando as células apresentadoras de antígenos entram em contato com as bactérias, ocorre a produção de IL-2, IL-23 e IL-27. Estas citocinas, principalmente a IL-2, são importantes na diferenciação nas células T inocentes em linfócitos T auxiliares tipo 1 e também na estimulação na produção de interferon gama por linfócitos T CD4. Durante o processo de apresentação do antígeno, célula T inocente que se diferenciou em linfócitos T auxiliares tipo 1, pode se diferenciar em linfócitos T auxiliares tipo 2 e produzir as IL-4, IL-5, IL 10 e IL-13, responsáveis pela resposta imune em doenças alérgicas. (8).

O reconhecimento de antígenos pelo sistema inato é mediado por um grupo de receptores que pertencem a diferentes famílias de proteínas. O processamento e apresentação dos antígenos inalados ocorrem principalmente no tecido linfóide, localizado no folículo ao longo da árvore brônquica, são estimulados pelos linfócitos B e T que se tornam células de memória efetora. As três principais funções dos linfócitos pulmonares são produção de anticorpos, atividade citotóxica e elaboração de mediadores inflamatórios. A citotoxicidade promovida pelas células T, células NK, anticorpo-dependentes e antígeno-restrita, tem um importante mecanismo de defesa, promovendo a lise das células infectadas por um vírus. (8).

Uma vez que os policiais militares estão constantemente expostos a situações consideradas gatilhos que desencadeiam a broncoconstrição: como alterações do ritmo circadiano devido escalas de serviços arrítmicas, estresse físico, estresse emocional, entre outros, é extrema prudência que estes passem por avaliações regulares.

Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da alteração crônica do ritmo circadiano em policiais da escala de turnos, em comparação com homens civis que trabalham em escala constante diurna, na resposta e função imune pulmonar e na resposta imune sistêmica.

2. ARTIGO

Life Sciences

Contact us Help ?

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Username: rodrilena@yahoo.com.br Switch To: Author Go to: My EES Hub

Version: EES 2019.6

Submissions Being Processed for Author Rodolfo Paula Vieira, Ph.D.

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	LFS-D-19-02968	Chronic Alteration of Circadian Rhythm in Policemen is Related to Impaired Lung Function and Immune Response	08/09/2019	08/09/2019	With Editor

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Chronic Alteration of Circadian Rhythm in Policemen is Related to Impaired Lung Function and Immune Response

Aquino-Santos HC^{1,2*}, Tavares-Vasconcelos JS^{3*}, Brandao-Rangel MAR^{2,4}, Cristina-Rosa A², Morais-Felix RT², Oliveira-Freitas S², Santa-Rosa FA³, Oliveira LVF^{4,5}, Bachi ALL^{4,5}, Alves TGG⁶, Barros AFF¹, Frison CR², Vieira RP^{1,2,6,7}

1- Post-graduation Program in Bioengineering, Universidade Brasil, Rua Carolina Fonseca 235, São Paulo – SP, 08230-030, Brazil.

2- Brazilian Institute of Teaching and Research in Pulmonary and Exercise Immunology (IBEPIPE), Rua Pedro Ernesto 240, São José dos Campos – SP, 12245-520, Brazil.

3- School of Physical Education of Military Police of State of São Paulo, Avenida Cruzeiro do Sul 548, São Paulo – SP, 01109-100, Brazil.

4- Centro Universitário UniEvangélica, Avenida Universitária KM 3,5, Setor Universitário, Anápolis – GO, 75083-515, Brazil.

5- Department of Otorhinolaryngology, Federal University of São Paulo (UNIFESP), Rua Pedro de Toledo 950, São Paulo – SP, 04038-002, Brazil.

6- Post-graduation Program in Sciences of Human Movement and Rehabilitation, Federal University of São Paulo (UNIFESP), Avenida Ana Costa 95, Santos – SP, 11060-001, Brazil.

7- School of Medicine, Anhembi Morumbi University, Avenida Deputado Benedito Matarazzo 4050, São José dos Campos – SP, 12230-002, Brazil.

*HCAS and JSTV have equally contributed to this study.

Running head: changes in circadian rhythm alters lung function.

Corresponding author:

Rodolfo Paula Vieira, PhD, Prof. Dr.

Post-graduation Program in Bioengineering, Universidade Brasil, Rua Carolina
Fonseca 235, São Paulo – SP, 08230-030, Brazil.

Phone/FAX: +55 11 2070-0025

E-mail: rodrelena@yahoo.com.br

Abstract

Aims: Alterations of the circadian rhythm negatively impact several aspects of the health, including the lung function. Chronic shiftwork scale classically induces alterations in the circadian rhythm. However, its effects on pulmonary immune response are unknown. **Main methods:** In this context, a 12h x 24h and 12h x 48h work scale in shiftwork scale policemen (n = 25; 38,73±6,92 years old) were compared with fixed work scale civil men (n = 25; 34,00±9,60 years old) who were evaluated for perceived stress, physical activity levels, anthropometric characteristics, sleepiness levels, lung function, pulmonary and systemic immune response. **Key findings:** The results showed that policemen presented reduced levels of perceived stress (p<0.0008), impaired sleepiness (p<0.04), lung function FVC (%) (p<0.053) and FEV1 (%) (p<0.043) when compared to civil men. The levels of cytokines in the breath condensate IFN-gamma, IL-10, IL-17 did not differ among the groups (p>0.05), while the levels of IL-2 were significantly higher in policemen comparing to civil men (p<0.0046). In addition, policemen presented increased levels of exhaled nitric oxide, a marker of chronic lung inflammation, compared to civil men (p<0.037). Concerning the systemic cytokines, no differences were found for IL-17 and IFN-gamma (p>0.05), while policemen presented higher levels of IL-2 (p<0.002) and lower levels of IL-10 (p<0.001). **Significance:** Chronic alteration of circadian rhythm in shiftwork scale policemen results in impaired lung function, beyond to impair pulmonary and systemic immune function.

Key words: lung function, lung immunology, circadian rhythm, stress, cytokines.

Introduction

The circadian rhythm is characterized by biological oscillations occurring into a period of 24 hours and are responsible for organic homeostasis. It can be influenced by changes in light, temperature, sleeping timing and quality and different types of stress (Lin and Farkas 2018). Shiftwork scale is believed to negatively affects circadian rhythm, resulting in impairment of different organs and physiological systems (Ella et al., 2018; Paganelli et al., 2018; Tarquini et al., 2019).

In this way, is widely accepted that alterations in the circadian rhythm can negatively affects the immune system (Ella et al., 2018; Paganelli et al., 2018), endocrine and metabolic response (Tarquini et al., 2019), cardiovascular response (Tarquini et al., 2019) and also the pulmonary response (Sundar et al., 2015). Specifically, on the immune-regulated pulmonary response, it has been demonstrated that circadian rhythm drives bronchoconstriction/bronchodilatation, increase in inflammation and airway resistance that cause worsening of respiratory symptoms and may lead to exacerbations, particularly in asthma (Paganelli et al., 2018) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (Liccardi et al., 2018). However, concerning the immune-regulated pulmonary response, the effects of altered circadian rhythm on pulmonary cytokines, has been never investigated.

In fact, the alterations of circadian rhythm lead to dysfunction of pulmonary but also to systemic immune responses (Ella et al., 2018; Paganelli et al., 2018; Sundar et al., 2015). In this context, it has been demonstrated that human monocytes obtained from individuals during the night, specifically during the sleep timing, release increased amounts of IL-12 (a pro-inflammatory cytokine) in response to endotoxin stimulation, while monocytes obtained during the day, responded to

increased release of IL-10 (an immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine) (Haimovich et al., 2010). In the same way, establishing a causal nexus, some studies have demonstrated that the frequency and severity of exacerbations of COPD and asthma are increased specially during the night and in the early hours of the morning, which are hallmarks of the interference of circadian rhythm (Liccardi et al., 2018; Paganelli et al., 2018). However, concerning the key role of cytokines in the immune system, at the moment, no study has evaluated the possible alterations in the cytokines levels in the lungs in response to chronic stress.

Thus, the present study investigated for the first time the effects of chronic alteration of circadian rhythm in shiftwork scale policemen compared to civil men working in a diurnal constant scale, on the pulmonary immune response and function, as well as on the systemic immune response.

Material and Methods

Study design

All proceedings performed in this study have been approved by local ethical committee from *Universidade Brasil* (registration number 3.020.830).

Fifty volunteers (25 sedentary civil individuals working into a normal diurnal fixed working day; 8 hours per day; ≥ 5 years; $34,00 \pm 9,60$ years old) and (25 sedentary military policemen working in a shiftwork scale 12 x 24 hours and 12 x 48 hours; ≥ 5 years; $38,73 \pm 6,92$ years old) were recruited and took part in the study, after agreement and signature of the term of consent. To be include into the study, the policemen must have at least ≥ 5 years working as policemen in the presented working scale, while the civil men should not have worked at least for 5 years into a

working scale that not in a fixed time (diurnal and for maximal 8 hours per day and 44 hours per week).

All volunteers were classified as non-obese, civil (BMI = $26,30 \pm 3,85$) and policemen (BMI = $28,58 \pm 5,28$), non-hypertensive, non-diabetics, without dyslipidemia, no cardiovascular diseases, never smokers and without any previous or current respiratory diseases. In addition, a complete body composition analysis using a multifrequential octopolar bioimpedance equipment, Bioscan 920 II S (Maltron Int, UK) was performed.

Evaluation of Quality of Life

Quality of life was evaluated by questionnaire short form 36 (SF36) (Laguardia et al., 2013).

Evaluation of Perceived Stress

The levels of perceived stress were evaluated by questionnaire Perceived Stress Scale (PSS) (Reis et al., 2010).

Evaluation of Sleepiness

The levels of sleepiness were evaluated by Epworth Sleepiness Scale (ESS) (Bertolazi et al., 2009).

Evaluation of Physical Activity / Inactivity Levels

Short form of International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) was used to evaluate the level of physical activity (Lee et al., 2011).

Lung Function

Lung function was evaluated through spirometry pre and post 400mcg of salbutamol sulfate, by using the forced maneuver and the Masterscreen spirometer (Jaeger, Germany). The following parameters were analyzed [forced vital capacity (FVC), expired forced volume in the first second (FEV1), the relation FEV1/FVC, peak expiratory flow (PEF), MEF25%, MEF50%, MEF75% (Culver et al., 2017).

Exhaled Nitric Oxide

The levels of nitric oxide in the exhaled air was measured by chemiluminescence by using the NOBreath monitor (Bedfont Scientific) (Inoue et al., 2018).

Pulmonary Immune Response

Pulmonary immune response was evaluated by measurements of the levels of IL-2, IL-10, IL-17 and IFN-gamma in the breath condensate by DuoSet ELISA kits (R&D Systems; MN, USA). Breath condensate was collected for 10 minutes using RT Tube (Respiratory Research, TX, USA) according to the manufacturer's recommendations and immediately stored in liquid nitrogen and further transferred to -86°C freezer, until the measurements were done, using a microplate reader Spectramax I3 (Molecular Devices, CA, USA).

Systemic Inflammation and Immune Response

Five milliliters of venous blood were collected by using vacuum tubes containing EDTA K2 as anticoagulant. The whole blood analysis (white and red series) was performed using the automated system Sysmex 800i (Sysmex Europe GmbH, Germany). Immediately after whole blood analysis, the blood tubes were centrifuged at 1000g, for 7 minutes at 4°C. The serum was stored until the measurements of IL-2, IL-10, IL-17 and IFN-gamma were done by DuoSet ELISA kits

(R&D Systems), using a microplate reader Spectramax I3 (Molecular Devices, CA, USA).

Statistical Analysis

The graphs were built, and the data were analyzed by using SigmaStat 5.0 software (California, USA). Normality of the data was evaluated by the Kolmogorov-Smirnov test. The data were submitted to an unpaired t test for a comparison between the groups. Significance values were adjusted to 5% ($p < 0.05$). The graphs were compiled using GraphPad Prism 5.0 software (California, USA).

Results

Chronic alteration of circadian rhythm impairs the levels of perceived stress and sleepiness

The Figure 1 showed that chronic alteration (≥ 5 years) of circadian rhythm induced by irregular and alternate work scale in policemen resulted in reduced perceived stress (Figure 1A; $p < 0.008$), when compared with civil men working in a diurnal 8 hours/day work scale. In addition, the evaluation of sleepiness by Epworth sleepiness scale revealed that policemen working in an irregular and alternate work scale resulted in increased sleepiness when compared with civil men (Figure 1C; $p < 0.04$). Together, these results point out that such irregular and alternate work scale in policemen can impairs two main parameters which modulates the circadian rhythm. For the other side, the evaluation of the levels of physical activity revealed no differences between civil and policemen (Figure 1B; $p > 0.05$).

Impact of chronic alteration in the circadian rhythm on lung function

Figure 2 showed that policemen working in an irregular and alternated scale presented impaired lung function, as denoted by reduced FVC (% predicted) (Figure 2A; $p < 0.053$) and FEV1 (% predicted) (Figure 2B; $p < 0.043$). However, other parameters of lung function, such as FEV1/FVC (% predicted) (Figure 2C; $p > 0.05$), PEF (% predicted) (Figure 2D; $p > 0.05$), MEF25% (% predicted) (Figure 2E; $p > 0.05$), MEF50% (% predicted) (Figure 2F; $p > 0.05$), MEF75% (% predicted) (Figure 2G; $p > 0.05$) and IN VC (% predicted) (Figure 2H; $p > 0.05$) when compared to civil men.

Chronic alteration in the circadian rhythm increases the levels of exhaled nitric oxide

Figure 3 showed that policemen working in an irregular and alternated scale presented increased levels of exhaled nitric oxide, a marker of chronic lung inflammation, as denoted by increases above 25 parts per billion when compared to civil men ($p < 0.037$).

Altered circadian rhythm reduces lung immune response

Figure 4 presented the influence of altered circadian rhythm on the levels of cytokines in the breath condensate. It was observed that the levels of IL-2 were significantly higher in policemen comparing to civil men (Figure 4A; $p < 0.004$). On the other hand, the results demonstrated that no statistical differences were observed for the levels of IFN-gamma (Figure 4B; $p > 0.05$), IL-10 (Figure 4C; $p > 0.05$), IL-17 (Figure 4D; $p > 0.05$).

Altered circadian rhythm reduces lung immune response

Figure 5 displayed that effects of altered circadian rhythm on the levels of systemic cytokines. It was observed that the levels of IL-2 were significantly higher in policemen comparing to civil men (Figure 4A; $p < 0.004$). On the other hand, the

results demonstrated that no statistical differences were observed for the levels of IFN-gamma (Figure 4B; $p>0.05$), IL-10 (Figure 4C; $p>0.05$), IL-17 (Figure 4D; $p>0.05$).

Discussion

The present study shows for the first time that chronic alterations of circadian rhythm related to stress in policemen impairs not only the perceived stress levels and sleepiness, but also the lung function and the pulmonary and the systemic immune response.

The association between chronic shiftwork with impaired perceived levels of stress is clearly established (Wirth et al., 2017), while the impact of such association in different organs and systems are less understood. Therefore, the present study shows for the first time that policemen working in a shiftwork scale for at least 5 years, present reduced levels of perceived stress, but with by impaired lung function and impaired systemic and pulmonary immune response.

Significant positive associations have been observed between stress indices and increased incidence of chronic diseases, such as cardiovascular and metabolic diseases (Allison et al., 2019; Magnavita et al., 2018), as well as systemic immune dysregulation (Wirth et al., 2017). Herein, the present study shows for the first time that compared with civil men working in a continuous 8 hours/day diurnal scale, without increased levels of perceived stress and sleepiness disturbance, policemen presented increased levels of serum IL-2. Increased levels of IL-2 plays a major role in the growth and proliferation of many immune cells such NK and T cells and is known as a pro-inflammatory cytokine. The activation of T lymphocytes via interleukin

IL-2 and IL-2 receptor plays an important role in pulmonary diseases such as asthma (Motojima et al., 1995; Park et al., 1994), in which airway obstruction is present at different levels. Furthermore, asthmatic patients have higher pulmonary levels of IL-2 compared to healthy subjects (Boonpiyathad et al., 2013). In addition, several studies have reported inverse association of pulmonary levels of IL-2 with the FEV1 in asthmatic individuals (Boonpiyathad et al., 2013; Park et al., 1994). Our findings show that police officers have higher levels of lung IL-2 compared to civilians, which were followed by impaired lung function, an event never demonstrated before. Of note, we reinforce that the present study demonstrates that chronic shiftwork scale leads to increased levels of perceived stress and impaired sleepiness, which can be related to increased levels of pulmonary IL-2 associated with reduced lung function.

Interestingly, higher levels of pulmonary IL-2 in asthmatic individuals present inverse association with FEV1 (Boonpiyathad et al., 2013; Park et al., 1994). In this way, the present study shows that non-asthmatic police officers, beyond increased pulmonary IL-2 levels and reduced FEV1, also presented increased levels of exhaled nitric oxide, a molecule involved with airway inflammation and obstruction (reduced FEV1) (Bennett et al., 2018). In fact, the present study showed that police officers presented increased levels of exhaled nitric oxide, slightly above 25 parts per billion (ppb), which significate airway inflammation (Korn et al., 2019). In addition, other sources of airway inflammation beyond allergen-induced asthma, such as nitrogen dioxide (a major traffic-related air pollutant) (Jiang et al., 2019), lipopolysaccharide (McCluskie et al., 2004; Ramos et al., 2010; Reis Gonçalves et al., 2012) and smoking (Torén et al., 2017) also can increase the levels of nitric oxide. Therefore, the present study showed that policemen working in a shiftwork scale clearly present

airway inflammation, characterized by increased levels of exhaled nitric oxide, although the source of such airway inflammation could not be confirmed in this study.

On the other side, increased levels of blood IL-10, an immunomodulatory and anti-inflammatory cytokine has been associated increased and better FEV1/FVC values, which is also an important marker of airway obstruction (Tricia et al., 2018). In the present study, it was found similar response, since policemen working in a shiftwork scale presented reduced levels of IL-10 and reduced FEV1. These findings reinforce the findings of previous studies performed in asthmatics (Tricia et al., 2018), demonstrating a possible association between lower levels of IL-10 with airway inflammation and airway obstruction. In fact, this concept that low levels of IL-10 can be associated with airway obstruction is strengthened by the present study, since that such phenomena was also found in non-asthmatic patients. In addition, reduced levels of IL-10 has been associated also with increased pulmonary inflammation induced by *Mycoplasma pneumoniae* (Ding et al., 2016), obstructive sleep apnea (Leon-Cabrera et al., 2015), and poor progression of COPD patients (Shenghua et al., 2018), demonstrating that perhaps, police officers could be more susceptible to develop pneumonias, obstructive sleep apnea and even COPD. However, the present studies have not evaluated such hypothesis and cannot confirm that policemen could be more susceptible to develop pneumonias, obstructive sleep apnea and COPD.

Conclusions

Alterations in chronic circadian rhythm in policemen worse the lung function beyond to impair pulmonary and systemic immune response.

Acknowledgements

This study was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP), grant #2012/15165-2 and by National Council of Research and Development (CNPq), grants 427889/2016-2 and 313299/2018-8.

References

Allison P, Mnatsakanova A, Fekedulegn DB, Violanti JM, Charles LE, Hartley TA, Andrew ME, Miller DB. Association of occupational stress with waking, diurnal, and bedtime cortisol response in policeofficers. *Am J Hum Biol.* 2019 Jul 22:e23296. doi: 10.1002/ajhb.23296. [Epub ahead of print].

Bennett GH, Carpenter L, Hao W, Song P, Steinberg J, Baptist AP. Risk factors and clinical outcomes associated with fixed airflow obstruction in older adults with asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2018 Feb;120(2):164-168.e1

Boonpiyathad S, Pornsuriyasak P, Buranapraditkun S, et al. Interleukin-2 levels in exhaled breath condensates, asthma severity, and asthma control in nonallergic asthma. *Allergy Asthma Proc.* 2013 Sep-Oct;34(5):e35-41.

Culver BH, Graham BL, Coates AL, Wanger J, Berry CE, Clarke PK, Hallstrand TS, Hankinson JL, Kaminsky DA, MacIntyre NR, McCormack MC, Rosenfeld M, Stanojevic S, Weiner DJ; ATS Committee on Proficiency Standards for Pulmonary Function Laboratories. Recommendations for a Standardized Pulmonary Function Report. An Official American Thoracic Society Technical Statement. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017 Dec 1;196(11):1463-1472.

Ding S, Wang X, Chen W, Fang Y, Liu B, Liu Y, Fei G, Wang L. Decreased Interleukin-10 Responses in Children with Severe *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia *PLoS One.* 2016; 11(1): e0146397.

Ella, K., Mócsai, A., Káldi, K., 2018. Circadian regulation of neutrophils: Control by a cell-autonomous clock or systemic factor? *Eur. J. Clin. Invest. Suppl 2*, e12965. doi: 101111/eci.12965.

Haimovich, B., Calvano, J., Haimovich, A. D., Calvano, S. E., Coyle, S. M., Lowry, S. F., 2010. In vivo endotoxin synchronizes and suppresses clock gene expression in human peripheral blood leukocytes. *Crit. Care Med.* 38(3), 751-758.

Inoue Y, Sato S, Manabe T, Makita E, Chiyotanda M, Takahashi K, Yamamoto H, Yanagida N, Ebisawa M. Measurement of Exhaled Nitric Oxide in Children: A Comparison Between NObreath® and NIOX VERO® Analyzers. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2018 Sep;10(5):478-489.

Jiang Y, Niu Y, Xia Y, Liu C, Lin Z, Wang W, Ge Y, Lei X, Wang C, Cai J, Chen R, Kan H. Effects of personal nitrogen dioxide exposure on airway inflammation and lung function. *Environ Res.* 2019 Aug 1;177:108620.

Korn S, Wilk M, Voigt S, Weber S, Keller T, Buhl R. Measurement of Fractional Exhaled Nitric Oxide: Comparison of Three Different Analysers. *Respiration.* 2019 Jul 9:1-8.

Lee PH, Macfarlane DJ, Lam TH, Stewart SM. Validity of the International Physical Activity Questionnaire Short Form (IPAQ-SF): a systematic review. *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2011 Oct 21;8:115.

Leon-Cabrera S¹, Arana-Lechuga Y², Esqueda-León E², Terán-Pérez G², Gonzalez-Chavez A³, Escobedo G⁴, Velázquez Moctezuma J². Reduced systemic levels of IL-10 are associated with the severity of obstructive sleep apnea and insulin resistance in morbidly obese humans. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:493409. doi: 10.1155/2015/493409. Epub 2015 Apr 6.

Lin, H-H., Farkas, M. E., 2018. Altered Circadian Rhythms and Breast Cancer: From the Human to the Molecular Level. *Front. Endocrinol.* 9, 219. doi: 10.3389/fendo.2018.00219.

Liccardi, G., Calzetta, L., Milanese, M., Salzillo, A., Manzi, F., , Marta Ferrari & Paola Rogliani (2018): Psychological Stress, Lung Function and Exacerbation Risk in COPD: Is an Increase of Cholinergic Tone a Possible Link?, *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, doi: 10.1080/15412555.2018.1459533.

Magnavita N, Capitanelli I, Garbarino S, Pira E. Work-related stress as a cardiovascular risk factor in police officers: a systematic review of evidence. *Int Arch Occup Environ Health.* 2018 May;91(4):377-389. doi: 10.1007/s00420-018-1290-y.

McCluskie K, Birrell MA, Wong S, Belvisi MG. Nitric oxide as a noninvasive biomarker of lipopolysaccharide-induced airway inflammation: possible role in lung neutrophilia. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Nov;311(2):625-33.

Motojima S, Hirata A, Kushima A, et al. Serum levels of soluble interleukin-2 receptor in asthma patients. *J Asthma* 32:151–158, 1995.

Paganelli, R., Petrarca, C., Di Gioacchino, M., 2018. Biological clocks: their relevance to immune-allergic diseases. *Clin. Mol. Allergy.* 16, 1. doi: 10.1186/s12948-018-0080-0.

Park CS, Lee SM, Chung SW, et al. Interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptor in bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchial asthma. *Chest* 106:400–406, 1994.

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.

Reis Gonçalves CT, Reis Gonçalves CG, de Almeida FM, Lopes FD, dos Santos Durão AC, dos Santos FA, da Silva LF, Marcourakis T, Castro-Faria-Neto HC, Vieira RP, Dolhnikoff M. Protective effects of aerobic exercise on acute lung injury induced by LPS in mice. *Crit Care.* 2012 Oct 18;16(5):R199.

Shenghua Jiang, Fenglian Shan, Youwen Zhang, Luning Jiang, Zhaozhong Cheng. Increased serum IL-17 and decreased serum IL-10 and IL-35 levels correlate with the progression of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2018; 13: 2483–2494.

Sundar, I. K., Yao, H., Sellix, M. T., Rahman, I., 2015. Circadian molecular clock in lung pathophysiology. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 309(10), L1056-L1075. doi: 10.1152/ajplung.00152.2015.

Tarquini, R., Carbone, A., Martinez, M., Mazzoccoli, G., 2019. Daylight saving time and circadian rhythms in the neuro-endocrine-immune-system: impact on cardiovascular health. *Intern. Emerg. Med.* 14 (1), 17-19. doi: 10.1007/s11739-01.

Torén K, Murgia N, Schiöler L, Bake B, Olin AC. Reference values of fractional excretion of exhaled nitric oxide among non-smokers and current smokers. *BMC Pulm Med.* 2017 Aug 25;17(1):118. doi: 10.1186/s12890-017-0456-9.

Tricia D. LeVan, Debra J. Romberger, Mohammad Siahpush, Brandon L. Grimm, Athena K. Ramos, Patrik L. Johansson, Tzeyu L. Michaud, Art J. Heires, Todd A. Wyatt & Jill A. Poole Relationship of systemic IL-10 levels with proinflammatory cytokine responsiveness and lung function in agriculture workers *Respiratory Research* volume 19, Article number: 166 (2018).

Wirth MD, Andrew ME, Burchfiel CM, Burch JB, Fekedulegn D, Hartley TA, Charles LE, Violanti JM. Association of shiftwork and immune cells among police officers from the Buffalo Cardio-Metabolic Occupational Police Stress study. *Chronobiol Int.* 2017;34(6):721-731. doi: 10.1080/07420528.2017.1316732.

Figure legends

Figure 1 – Figure 1A shows the stress scale. Figure 1B shows the physical activity levels. Figure 1C shows the levels of sleepiness by Epworth sleepiness scale.

Figure 2 – Figure 2A shows the values of forced vital capacity (FVC). Figure 2B shows the values of forced expiratory volume in the first second (FEV1). Figure 2C shows the values of FEV1/FVC. Figure 2D shows the values for peak expiratory flow (PEF). Figure 2E shows the values for mean expiratory flow at 25% of FVC curve. Figure 2F shows the values for mean expiratory flow at 50% of FVC curve. Figure 2G shows the values for mean expiratory flow at 75% of FVC curve. Figure 2H shows the values of inspiratory vital capacity.

Figure 3 – Figure 3 shows the levels of exhaled nitric oxide. Results are expressed in parts per billion (ppb).

Figure 4 – Figure 4 shows the levels of cytokines in the breath condensate. Figure 4A shows the levels of IL-2. Figure 4B shows the levels of IL-10. Figure 4C shows the levels of IL-17. Figure 4D shows the levels of IFN-gamma.

Figure 5 – Figure 5 shows the levels of cytokines in the serum. Figure 5A shows the levels of IL-2. Figure 5B shows the levels of IL-10. Figure 5C shows the levels of IL-17. Figure 5D shows the levels of IFN-gamma.

Figures

Figure 1

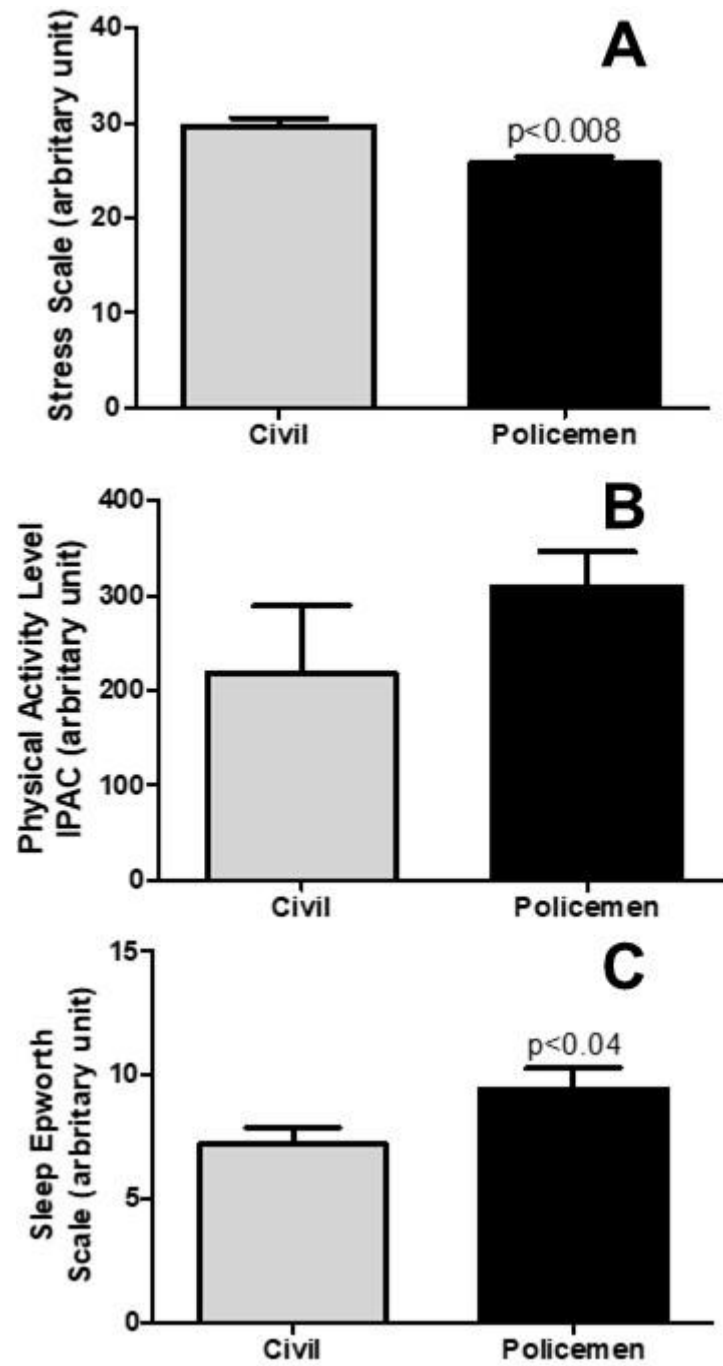


Figure 2

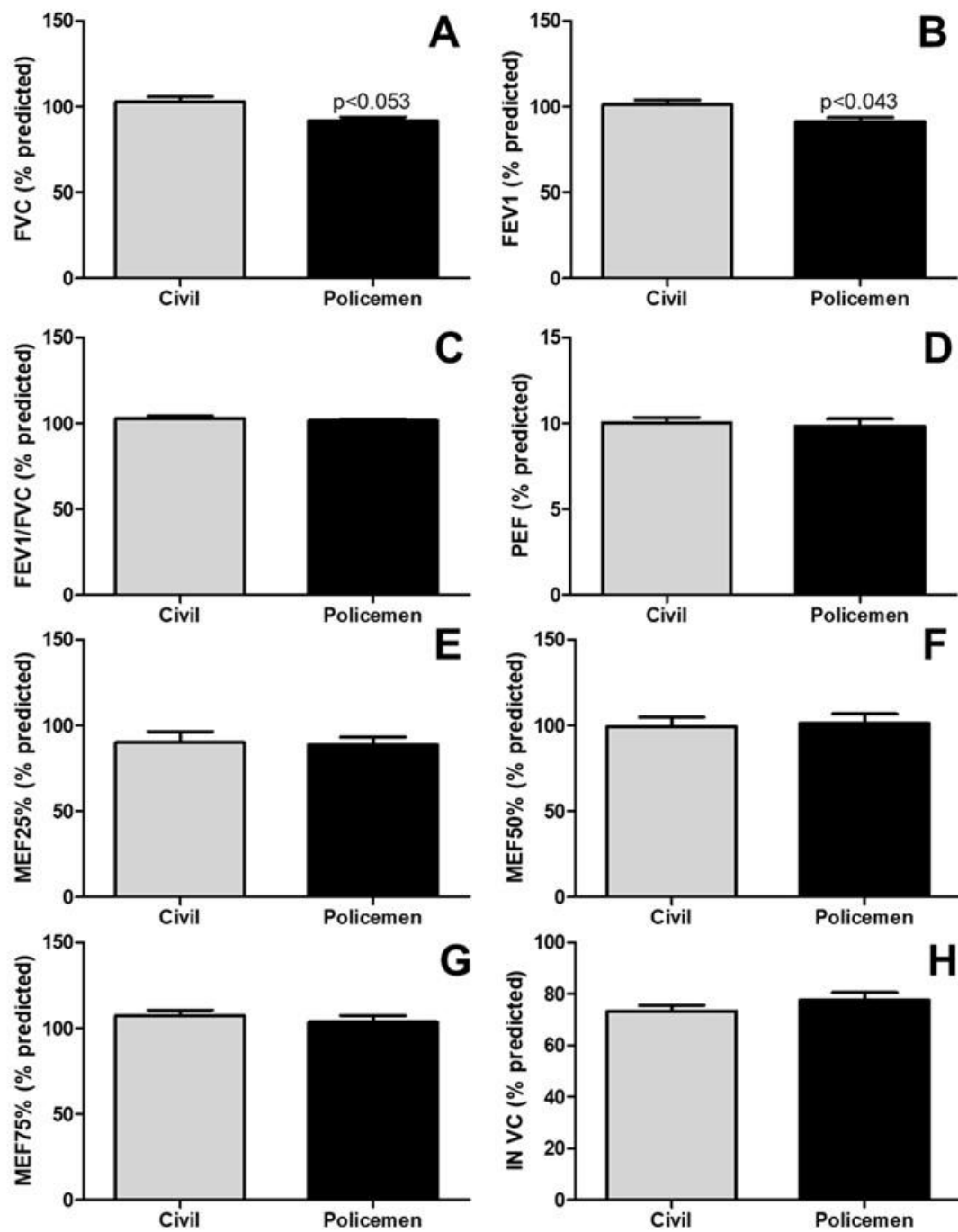


Figure 3

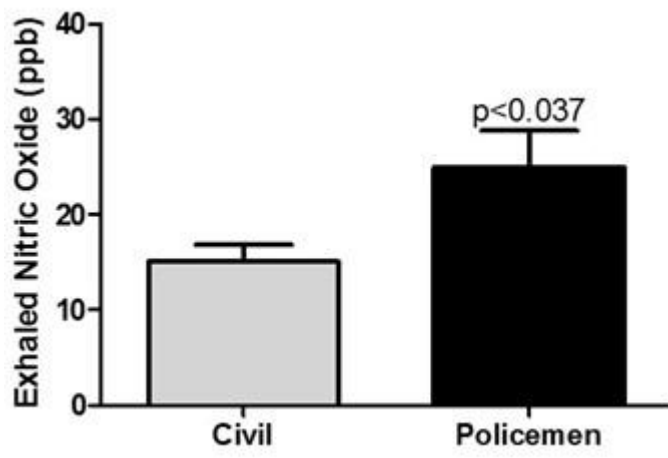


Figure 4

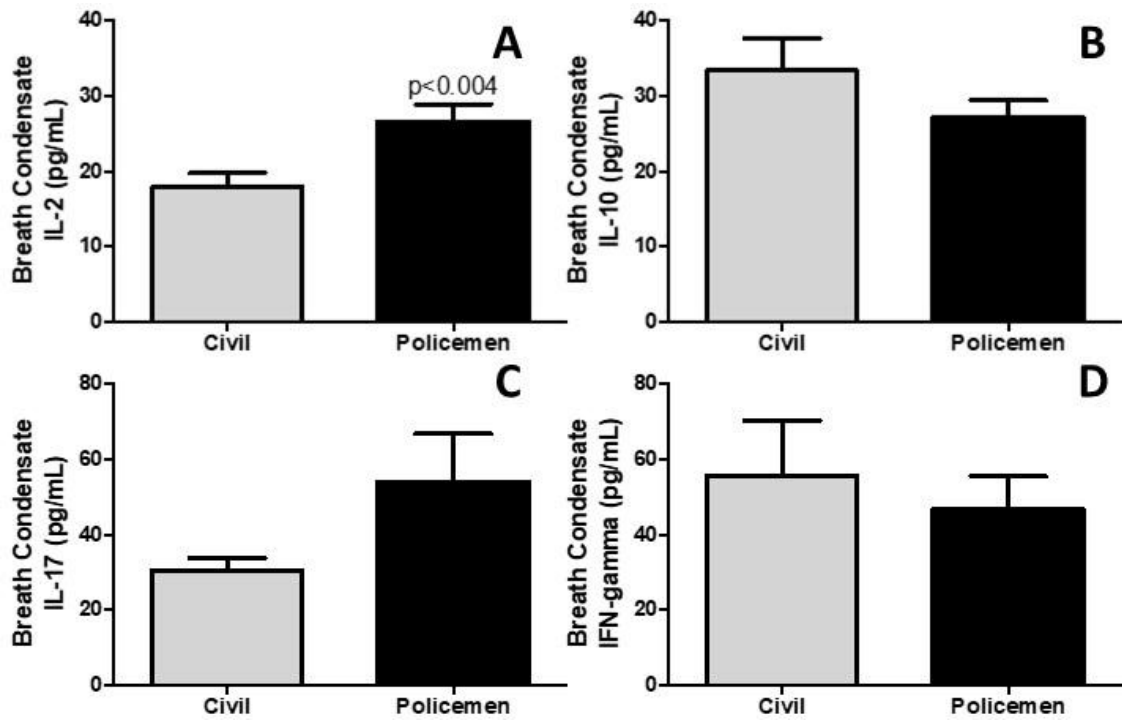
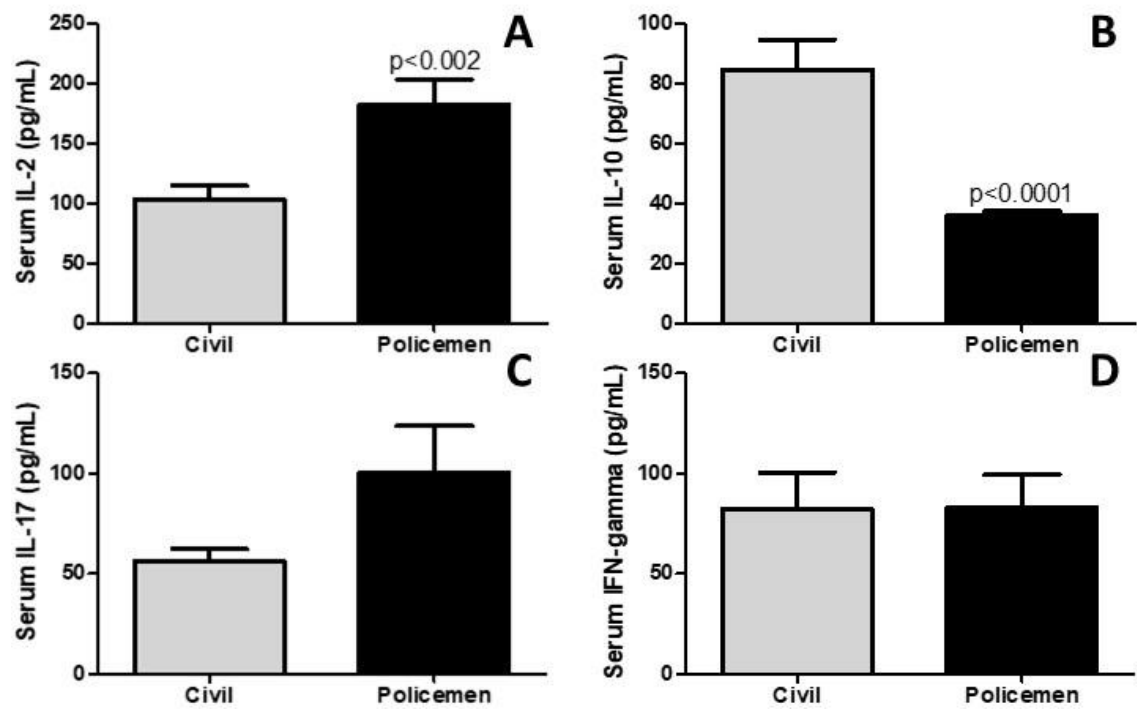


Figure 5



3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa iniciou-se em 2017 com a avaliação de 25 voluntários do sexo masculino do Batalhão da Polícia Militar do município de São José dos Campos – SP com autorização prévia do comando geral do batalhão e 25 voluntários do sexo masculino civil, ambos os grupos (militares e civis) não praticantes de atividade física. Foram realizados exames de espirometria pré e pós broncodilatador, exame físico (antropometria, IMC), coleta óxido nítrico exalado (NO), ar condensado, sangue (hemograma), além dos questionários de qualidade de vida (SF-36 curto), IPAQ (curto), escala de sonolência (Epworth) e escala de stress percebido (PSS).

A pretensão inicial era analisar os efeitos da alteração crônica do ritmo circadiano e sua resposta na função imune pulmonar e na resposta imune sistêmica, em policiais que trabalham com escala de turnos e comparar com civis que trabalham em escala de 8 horas constante diurna com idade entre 20 e 59 anos, não praticante de atividade física regular.

Após estudos concluímos que as alterações crônicas no ritmo circadiano pioram a função pulmonar além de prejudicar a resposta imune pulmonar e sistêmica em policiais que trabalham com escala de turnos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- I Consenso Brasileiro de Espirometria. *Jornal de Pneumologia* – Volume 22 (3), 2002.
- 2- Ella, K., Mócsai, A., Káldi, K., 2018. Circadian regulation of neutrophils: Control by a cell-autonomous clock or systemic factor? *Eur. J. Clin. Invest. Suppl 2*, e12965. doi: 101111/eci.12965.
- 3- Guynton A. C.; Hall J. E.; *Tratado de fisiologia médica*; Ed. Elsevier; Rio de Janeiro (RJ); 13 Edição; 2017.
- 4- Haimovich, B., Calvano, J., Haimovich, A. D., Calvano, S. E., Coyle, S. M., Lowry, S. F., 2010. In vivo endotoxin synchronizes and suppresses clock gene expression in human peripheral blood leukocytes. *Crit. Care Med.* 38(3), 751-758.
- 5- Korn S, Wilk M, Voigt S, Weber S, Keller T, Buhl R. Measurement of Fractional Exhaled Nitric Oxide: Comparison of Three Different Analysers. *Respiration.* 2019 Jul 9:1-8.
- 6- Lin, H-H., Farkas, M. E., 2018. Altered Circadian Rhythms and Breast Cancer: From the Human to the Molecular Level. *Front. Endocrinol.* 9, 219. doi: 10.3389/fendo.2018.00219.
- 7- Liccardi, G., Calzetta, L., Milanese, M., Salzillo, A., Manzi, F., , Marta Ferrari & Paola Rogliani (2018): Psychological Stress, Lung Function and Exacerbation Risk in COPD: Is an Increase of Cholinergic Tone a Possible Link?, *COPD:*

- Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, doi: 10.1080/15412555.2018.1459533.
- 8- Paganelli, R., Petrarca, C., Di Gioacchino, M., 2018. Biological clocks: their relevance to immune-allergic diseases. *Clin. Mol. Allergy.* 16, 1. doi: 10.1186/s12948-018-0080-0.
- 9- Roitt I.; Brostoff J.; Male D.; *Imunologia*; Ed. Manole, São Paulo (SP); 13ª Edição, 2018.
- 10-Sundar, I. K., Yao, H., Sellix, M. T., Rahman, I., 2015. Circadian molecular clock in lung pathophysiology. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 309(10), L1056-L1075. doi: 10.1152/ajplung.00152.2015.
- 11-Tarantino A. B.; *Doenças Pulmonares*, Ed. Guanabara Koogan; Rio de Janeiro (RJ); 6ª Edição; 2008.
- 12-Tarquini, R., Carbone, A., Martinez, M., Mazzoccoli, G., 2019. Daylight saving time and circadian rhythms in the neuro-endocrine-immune-system: impact on cardiovascular health. *Intern. Emerg. Med.* 14 (1), 17-19. doi: 10.1007/s11739-01.
- 13-West J. B.; *Fisiologia respiratória*, Ed. Manole; Barueri (SP); 8ª Edição; 2012.
- 14-West J. B.; *Fisiopatologia respiratória*, Ed. Manole; Barueri (SP); 9ª Edição, 2013.