



20º Congresso de Iniciação Científica

EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO DIAFRAGMÁTICA ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA (EDET) NA FIBROSE PULMONAR PROVOCADA POR BLEOMICINA. ANÁLISES HISTOMÉTRICAS E HISTOPATOLÓGICAS

Autor(es)

TAÍSA CRESPI GONÇALVES

Orientador(es)

MARIA LUIZA OZORES POLACOW

Apoio Financeiro

PIBIC/CNPq

1. Introdução

A bleomicina faz parte de um grupo de glicopeptídeos utilizado como antibiótico citotóxico que possui uma ação antineoplásica potente contra vários tipos de tumores, principalmente linfomas e carcinomas de cabeça e pescoço (YAMAUCHI et al., 2011). Este fármaco causa como efeito colateral fibrose pulmonar. Segundo Moeller et al. (2008), o modelo de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina em ratos é uma ferramenta útil para avaliar os mecanismos gerais da fibrose e os potenciais efeitos de procedimentos propostos. Amostras histológicas mostraram inflamação mais evidente em 7 e 14 dias após a administração da bleomicina sendo que após 28 dias o processo inflamatório estava amenizado (JI LI et al., 2006). A estimulação diafragmática elétrica transcutânea (EDET), é uma especificidade da fisioterapia, utilizada para melhorar a função ventilatória, auxiliando pacientes com fraqueza dos músculos respiratórios ou submetidos à ventilação mecânica. É estudada desde o século passado. Pesquisas realizadas por Geddes; Voorhees; Bouland (1990), determinaram os parâmetros para aplicação da EDET em humanos. Assim, vários trabalhos apontaram benefícios como o incremento da força na musculatura respiratória (CRINER et al., 1999; NASCIMENTO; AQUIM, 2000; FORTI, 2009). Segundo Green et al., (2001), pacientes submetidos a treinamento muscular profilático obtiveram melhora da força e função muscular respiratória, além da melhora da oxigenação, ventilação e diminuição no tempo de hospitalização. Em 2007, Cancelliero adaptou a EDET para aplicação em ratos, desenvolvendo um protocolo similar ao utilizado no ser humano. Os resultados encontrados reiteraram a eficácia da EDET na melhora das condições energéticas da musculatura respiratória, além da alteração na tipagem de fibra muscular diafragmática. No entanto o efeito do tratamento com EDET no tecido pulmonar com fibrose já instalada provocada pela bleomicina não foi estudada. Com os mesmos parâmetros dos utilizados por Cancelliero (2007), trabalhos preliminares de nosso grupo de pesquisa (SANTOS; POLACOW, 2009; SANTOS; POLACOW, 2010) observaram que o tratamento com bleomicina promoveu espessamento dos septos interalveolares e conseqüentemente redução da área alveolar, com aumento de fibroblastos e leucócitos. Foi observado também que a EDET aplicada precocemente (logo após administração de Bleomicina) conseguiu evitar estes efeitos deletérios. Tais estudos mostram a importância da utilização da EDET e sua evolução em diversas patologias e em situações nas quais há a disfunção ou o desuso muscular. No entanto, os poucos trabalhos obtidos na literatura, abordando os parâmetros e efeitos deste recurso foram realizados em seres humanos, e suas análises se limitam principalmente à espirometria e força muscular respiratória. Além disso, em humanos há a dificuldade de se obter dados de efeitos fisiológicos e histológicos, só possíveis em estudos invasivos. Assim, aventa-se a hipótese de que a EDET poderia ser um recurso complementar na área da fisioterapia respiratória, minimizando os efeitos de uma fibrose pulmonar.

2. Objetivos

Estudar os efeitos da estimulação diafragmática elétrica transcutânea sobre as alterações histopatológicas e histométricas de pulmão de ratos tratados com bleomicina.

3. Desenvolvimento

Este trabalho foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de São Carlos CEUA/UFSCar sob o protocolo nº 011/2011. Foram utilizados 28 ratos Wistar, com 3 a 4 meses, alimentados com ração e água ad libitum, e divididos em 4 grupos (n=7): 1) C controle, 2) EDET tratados com EDET por 7 dias, 3) tratados com bleomicina (BLEO) - 2,5mg/Kg via intratraqueal em dose única (BELLER et al, 2004), eutanasiados após 7 dias e 4) tratados com bleomicina e EDET, iniciando o tratamento com EDET 7 dias após a administração da bleomicina. Foi utilizado BONAR (sulfato de bleomicina) 15U - pó líofilo injetável, sendo a concentração de 0,2 ml para média de 200g dos animais. A estimulação elétrica foi realizada durante 7 dias consecutivos por 20 minutos, sendo a frequência de 50Hz (ciclos por segundo), Ton de 2 segundos (tempo de contração), Toff de 2 segundos (tempo de relaxamento) e a largura de fase (duração de pulso) de 0,4 milissegundos (ms). A intensidade (amplitude do pulso) foi padronizada em 5.0 miliampères (mA), a partir da visualização da contração muscular, sendo que a cada 3 minutos foi aplicado um acréscimo de 1.0mA à corrente, minimizando a acomodação do diafragma. O equipamento utilizado para a estimulação elétrica foi o Dualpex 961 (QUARK), além de dois eletrodos de silicone-carbono com área de 1,5x2,0 cm cada e gel de acoplamento. Os dois eletrodos foram posicionados bilateralmente na região lateral do tórax entre a 4ª e a 6ª costela, no ponto médio entre o cotovelo e a última costela do animal. A área de posicionamento dos eletrodos foi previamente tricotomizada. Após a eutanásia dos animais, foram retirados 5 fragmentos de pulmão, que foram então fixados em solução tamponada de formol a 10% e posteriormente processados para inclusão em paraplást e coloração em Hematoxilina e Eosina. Cinco cortes de 6 m de espessura foram obtidos de cada fragmento, e de cada corte foram selecionadas 5 áreas captadas por uma câmera digital acoplada a um computador. A densidade de área da porção alveolar, foi realizada utilizando-se o software de análise de imagem Image Pró-plus 6.2 (MediaCybernects), por meio de planimetria por contagem de pontos, segundo Mandarim de Lacerda (2004) Um microscópio de luz com objetiva de 100x foi adaptado com uma ocular reticulada (Carl Zeiss, K 10x/18) onde foram computados o número de fibroblastos, leucócitos e macrófagos presentes nos septos interalveolares em 10 áreas de 100 m². Essa contagem foi realizada em duplicata em cada grupo experimental, sendo um total de área de 2000 m² por animal. Análise dos dados: Foi verificada a normalidade da amostra pelo teste Kolmogorov-Smirnov, sendo este positivo, optou-se por uma estatística paramétrica. Utilizou-se Anova one way seguido de pós hoc de Bonferroni, considerando o p<0,05. A análise foi processada pelo software SPSS 13.0.

4. Resultado e Discussão

A Tabela 1 mostra a densidade de área da parte aérea pulmonar, onde se observa uma diferença significativa entre os grupos BLEO e B+EDET em relação aos grupos controle e EDET, considerando p<0,05. Mas entre os grupos BLEO e B+EDET não foi encontrada diferença significativa. Assim como os achados da literatura, os resultados obtidos neste trabalho revelaram também uma diminuição na densidade de área nos grupos que receberam a instilação da bleomicina, o que demonstra a intensidade do seu efeito colateral (MARTINEZ et al., 2008). No entanto, o recurso fisioterapêutico utilizado não se mostrou eficaz em reduzir a área ocupada pelo tecido pulmonar já na fase crônica da reação inflamatória. Pelas fotomicrografias selecionadas aleatoriamente, pode-se observar a espessura dos septos interalveolares. No grupo controle e EDET, observa-se que os septos são mais delgados. Já nos grupos BLEO e B+EDET, pode-se perceber que os septos estão mais espessos (figura 1). Segundo Izbicki (2002), o melhor período para avaliar a fibrose pulmonar é no 14º dia após a instilação. Nos primeiros 7 dias após a instilação da bleomicina, inicia-se o processo inflamatório, aumentando a concentração de citocinas e células pró-inflamatórias, tais como o TGF- β (HAGIWARA et al, 2000; KAMINSKI et al, 2000). Em relação à análise do número de células presentes no septo interalveolar, houve um aumento de 33,3% no número de fibroblastos quando comparado o grupo B+EDET ao grupo controle. O número de leucócitos foi significativamente maior no grupo Bleomicina quando comparado ao controle, com um aumento de 93,6%. O grupo bleomicina apresentou um aumento de 357,1% no número de macrófagos comparado ao grupo controle e o grupo B + EDET apresentou uma redução de 60% do grupo Bleomicina, conforme mostra a Tabela 2. Gharraee-Kermani; Phan (2005) relatam que pela lesão pulmonar ocorre um recrutamento das células de defesa, como leucócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos, e estas células ativadas produzem citocinas reativas ao oxigênio (ROS), quimiocinas, e proteases, que conseqüentemente aceleram a migração de mais leucócitos para a região afetada. A EDET, embora não tenha provocado mudanças na densidade de área pulmonar, foi capaz de produzir uma melhora no quadro inflamatório. Os resultados mostram que o número de leucócitos foi 20,6% menor nos animais do grupo B+EDET em relação aos que utilizaram apenas a bleomicina e, quanto aos macrófagos, a redução foi de 60,9%, diferença significativa (p<0,05). Esses achados sugerem que a EDET limitou a reação inflamatória. Os fibroblastos são as células mais abundantes do tecido conjuntivo, e são responsáveis pela síntese e renovação das substâncias da matriz extracelular (MEC). Normalmente, são estimulados pela reação

inflamatória, uma importante característica da inflamação crônica e do reparo tecidual (COTRAN et al, 2000). Pode-se inferir que estas células em maior número estejam envolvidas na remodelação da MEC, nesta reação inflamatória crônica. Esta inferência só poderá ser confirmada com futuros trabalhos que possam avaliar a quantidade, bem como o grau de organização das fibras colágenas na MEC do tecido pulmonar nestas condições.

5. Considerações Finais

Diante do exposto, conclui-se que o tratamento com bleomicina promoveu espessamento dos septos interalveolares e consequente redução da área alveolar, com aumento dos fibroblastos, leucócitos, e macrófagos, e a estimulação diafragmática elétrica transcutânea aplicada tardiamente não foi capaz de reverter os efeitos do fármaco, porém o recurso atenuou a inflamação pulmonar.

Referências Bibliográficas

BELLER, T.C. et al. Cysteinyl leukotriene 1 receptor controls the severity of chronic pulmonary inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci*, v. 101, n. 9, p. 3047-3052, 2004.

BRISTOL-MYERS SQUIBB FARMACÊUTICA LTDA. Blenoxane Sulfato de bleomicina.

CANCELLIERO, K.M. Estimulação elétrica transcutânea (EDET) em ratos com fibrose pulmonar induzida por bleomicina. Tese (Doutorado). PG - Fisioterapia UFSCar, 2007, 114p.

COTRAN R.S.; COLLINS, T.; KUMAR, V. Reparo de Tecidos: Crescimento Celular, Fibrose e Cicatrização de Feridas. In: *Patologia Estrutural e Funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.95.

CRINER, G.J. et al. Variability of electrophrenic diaphragm twitch stimulation over time in normal subjects. *Respir Physiol*, v. 118, n.1, 39-37.1999.

FORTI, E.M.P. et al. Effects of chest physiotherapy on the respiratory function of postoperative gastroplasty patients. *Clinics*, v. 64, n. 7, 683-689, 2009.

GEDDES, L.A.; VOORHEES, W.D.; BOULAND, J.D. Optimum stimulus frequency for contracting the inspiratory muscle with chest-surface electrodes to produce artificial respiration. *Ann Biomed Eng*, v. 18, p. 103-108, 1990.

GHARAEI-KERMANI, M.; PHAN, S. H. Molecular mechanisms of and possible treatment strategies for idiopathic pulmonary fibrosis. *Curr Pharm Des*, v. 11, n. 30, p. 3943-3971, 2005.

GREEN, R.H. et al. A randomized controlled trial of four weeks versus seven weeks of pulmonary rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, v. 56, p. 143-145, 2001.

HAGIWARA, S.I.; ISHII, Y.; KITAMURA, S. Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 162, n. 1, p. 225-231, 2000.

IZBICKI, G. et al. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Path*, v. 83, n. 3, p. 111-119, 2002.

JI LI, Y. et al. EM703 improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by the inhibition of TGF- β signaling in lung fibroblasts. *Respir Res*, v. 7, n. 1, p. 16, 2006.

KAMINSKI, J. et al. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci* v. 97, p. 17781783, 2000.

MANDARIN DE LACERDA, C.A.. Manual de quantificação morfológica: morfometria, alometria, esteriologia. 2 ed. Rio de Janeiro: CEBIO, 1994.

MARTINEZ, J.A.B. et al. Efeitos da quercetina na lesão pulmonar induzida por bleomicina: um estudo preliminar. *J Bras Pneumol*, v. 34, n. 7, p. 445-452, 2008.

MOELLER, A. et al. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis?

NASCIMENTO, P.; AQUIM, E.E. A aplicação da eletroestimulação transcutânea diafragmática em indivíduos normais. *Fisio Brasil*, v. 1, n. 1, 15-18, 1990.

SANTOS, L. A.; POLACOW, M. L. O. Análise histopatológica de pulmão de ratos tratados com bleomicina e com estimulação diafragmática elétrica transcutânea. In: MOSTRA ACADÊMICA UNIMEP, 7., 2009, Piracicaba.

SANTOS, L. A.; POLACOW, M. L. O. Efeitos da estimulação diafragmática elétrica transcutânea (EDET) no pulmão de ratos tratados com bleomicina. Análises histométricas e histoquímicas. In: MOSTRA ACADÊMICA UNIMEP, 8., 2010, Piracicaba.

YAMAUCHI, K. et al. Attenuation of lung inflammation and fibrosis in CD69-deficient mice after intratracheal bleomycin. *Respir Res*, v. 12, n. 1, p. 131, 2011.

Anexos

Tabela 1. Média \pm dp da densidade de área (%) da porção alveolar no tecido pulmonar de ratos do grupo Controle, EDET, BLEO e B+EDET.

| <i>Grupos experimentais</i> | <i>Média \pm dp</i> |
|-----------------------------|----------------------------------|
| Controle | 50,12 \pm 8,83 |
| EDET | 48,41 \pm 9,28 |
| Bleomicina | 39,63 \pm 8,19*# |
| B+EDET | 36,88 \pm 8,34*# |

dp = desvio padrão; p<0,05; * comparado ao Controle e # comparado ao EDET

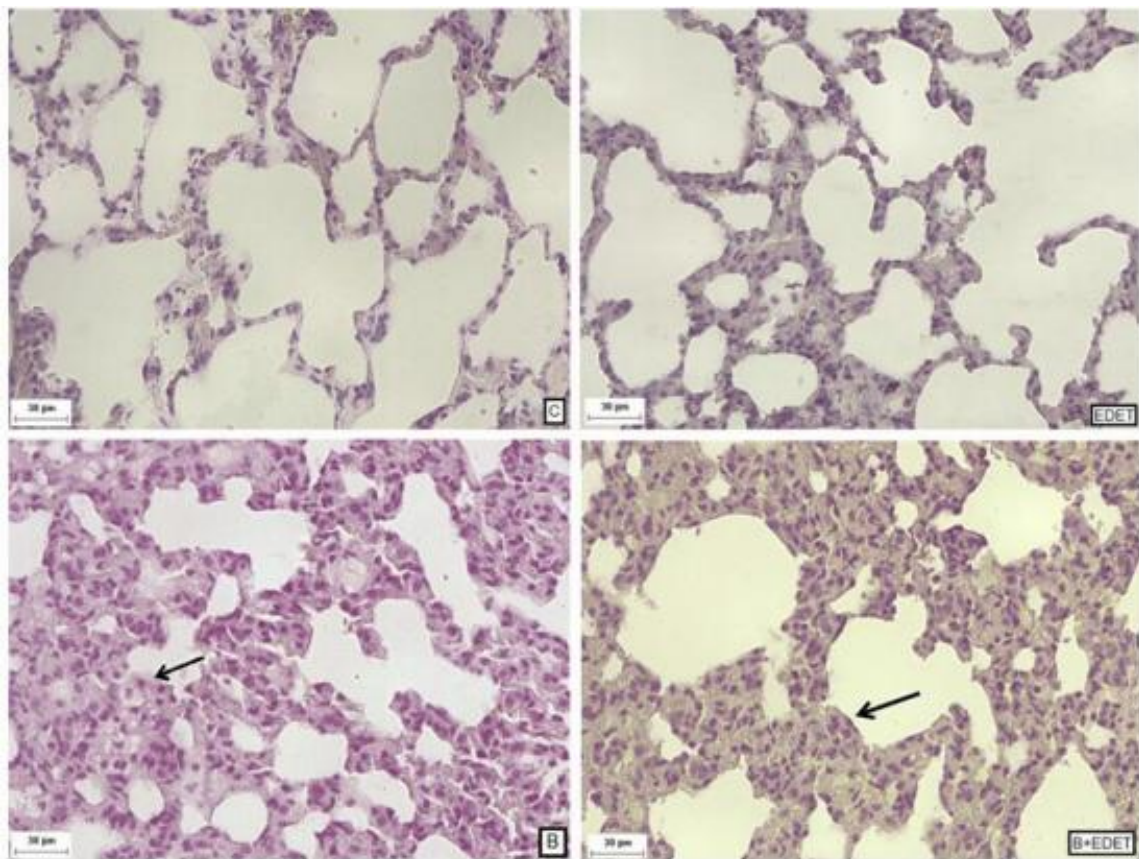


Figura 1. Fotomicrografias de pulmão dos grupos: controle (C), estimulado (EDET), tratado com bleomicina (B) e tratado com bleomicina + EDET (B+EDET). Observar o espessamento dos septos interalveolares nos grupos B e B+EDET - seta (Hematoxilina-Eosina, 40x).

Tabela 2. Média e desvio padrão do número de fibroblastos, leucócitos e macrófagos presentes no septo interalveolar em uma área de 100 µm².

| Grupos experimentais | Fibroblastos | Leucócitos | Macrófagos |
|-----------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| Controle | 7,50±0,50 | 1,10±0,14 | 0,56±0,10 |
| EDET | 9,18±1,08 | 1,13±0,29 | 1,19±0,41 |
| Bleomicina | 8,70±1,11 | 2,13±0,88* | 2,56±0,56* |
| B+EDET | 10,00±1,45* | 1,69±0,88 | 1,00±0,56# |

p<0,05; * comparado ao Controle e # comparado a Bleomicina