



10º Congresso de Pós-Graduação

EFEITO DA BLEOMICINA E DA ESTIMULAÇÃO DIAFRAGMÁTICA ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA (EDET) SOBRE A GLICEMIA E PESO DE ÓRGÃOS EM RATOS WISTAR

Autor(es)

LAISA ANTONELA DOS SANTOS

Co-Autor(es)

TAISA CRESPI GONÇALVES
CARLOS ALBERTO DA SILVA

Orientador(es)

MARIA LUIZA OZORES POLACOW

1. Introdução

O sulfato de bleomicina é um agente antineoplásico, utilizado por pacientes portadores de carcinoma, que tem como principal efeito colateral a capacidade de gerar fibrose pulmonar, seu efeito tóxico, motivo pelo qual é utilizado em modelos experimentais em animais. No entanto, o mecanismo envolvido na indução dessa doença não tem sido completamente entendido (SLEIFER, 2001).

Segundo Hagiwara et al. (2000), o modelo de fibrose pulmonar induzido pela bleomicina em ratos é uma ferramenta útil para avaliar os mecanismos gerais da fibrose, principalmente aqueles mediados por radicais livres de oxigênio (ROS). Trabalho de Hong et al. (2003) mostrou que a permeabilidade mitocondrial de macrófagos alveolares e de células epiteliais pulmonares está envolvida na toxicidade e formas de injúria celular quando expostos à bleomicina, e resultaram em acúmulo de citocromo c no citosol, aumento na formação das ROS, levando à apoptose destas células.

Stevenson et al. (2006), mostraram também que a produção de ROS pode aumentar o dano pulmonar por inativação de antiproteases, o rompimento de membranas e dano alveolar.

A estimulação elétrica é considerada uma modalidade útil de assistência à contração muscular para indivíduos que apresentam dificuldade na realização do exercício voluntário (HAMADA et al., 2003).

Assim a estimulação diafragmática elétrica transcutânea (EDET), é uma especificidade utilizada para melhorar a função ventilatória, auxiliando pacientes com fraqueza dos músculos respiratórios ou submetidos á ventilação mecânica. 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. Vários trabalhos apontaram benefícios como o incremento da força na musculatura respiratória (CRINER et al., 1999; NASCIMENTO; AQUIM, 2000; FORTI, 2008).

Em 2007, Cancelliero adaptou a EDET para aplicação em ratos, desenvolvendo um protocolo similar ao utilizado no ser humano. Nestes trabalhos (Cancelliero et al., 2006; Cancelliero, 2007), foram realizadas avaliação ampla dos músculos respiratórios, componentes plasmáticos e funções de alguns órgãos, focalizando a homeostasia do organismo, uma vez que a indução da fibrose pulmonar foi realizada por um fármaco que pode trazer outros efeitos colaterais.

Sendo assim, em decorrência das alterações desencadeadas pelo uso da bleomicina e da estimulação diafragmática, aventa-se a hipótese de que tais recursos associados possam modificar os parâmetros glicêmicos e fisiológicos, como o peso de órgãos, de tecidos que não é o alvo principal destes recursos.

2. Objetivos

Estudar as possíveis alterações glicêmicas, a relação do peso corporal e do peso de alguns órgãos como timo, baço, fígado, adrenais e gordura periepídídima dos ratos com fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratados com estimulação diafragmática elétrica transcutânea.

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.

Utilizaram-se para o experimento 27 ratos machos da linhagem Wistar, com idade variando de três a quatro meses, divididos em três grupos: grupo controle (C) n= 11, grupo tratado com bleomicina (B) n=8 - 2,5mg/Kg via intratraqueal, em dose única (BELLER et al., 2004) e grupo tratado com bleomicina e após 7 dias com a EDET (BE) n=8 - com tratamento diário de 20 minutos, por 7 dias, sendo os parâmetros utilizados: 50 Hertz, Ton de 2 segundos, Toff de 2 segundos e largura de fase de 0,4 milissegundos, com intensidade de 5.0 miliamperes (CANCELLIERO, 2007).

Os animais submetidos ao tratamento com EDET foram anestesiados com uma mistura de Dopalen® (Cloridrato de Cetamina) 1,16 g/10 mL e Rompun® (Cloridrato de Xilazina) 2 g/100 mL, na proporção 3:2, em dose de 0,09 mL/100 g e 0,06 mL/100 g de massa corporal, respectivamente, via intramuscular.

Após a eutanásia foi realizada a pesagem dos órgãos timo, baço, fígado, adrenais e gordura periepídídima com uma balança analítica micronal® – B400, e para a pesagem do peso corporal utilizou-se uma balança analítica Gehaka® – BG 100. A glicemia dos ratos foi aferida por meio de um corte na cauda do animal, onde uma alíquota de sangue foi coletada e a glicemia foi avaliada com fita usada em glicoteste (Rafacho et al., 2007).

Análise dos dados: Inicialmente foi verificada a normalidade dos dados, sendo utilizada estatística paramétrica para os dados normais, e estatística não paramétrica para os dados não normais, sempre considerando $p < 0,05$. Para análise foi utilizado o software Bioestat 5.0.

4. Resultado e Discussão

O grupo BE apresentou uma redução significativa de 50% no peso do timo comparado ao grupo C e de 53,3 no peso do timo em relação ao grupo B.

Segundo Chinn et al. (2012) o timo se desenvolve durante a vida fetal, atingindo seu crescimento máximo no período pós-natal precoce, sendo que a involução tímica ocorre durante a idade adulta, associada a diminuição da função imune, que leva ao aumento de morbidade e de mortalidade nos idosos.

Entretanto, Domínguez-Gerpe e Rey-Méndez (1999) demonstraram que o timo pode responder a diferentes estímulos, sendo a perda de massa do timo e a involução intransitória alterações comumente observadas. Diversos fatores podem promover a involução ou perda de massa do timo, tais como gravidez, hibernação, infecção, doenças, certas formas de terapia, e uma grande variedade de substâncias, além do estresse crônico. Neste estudo associou-se o uso de um fármaco e de uma corrente de estimulação elétrica e ambos os recursos promoveram uma redução na massa tímica, maior quando tais recursos foram associados.

Marin, Cruz e Planeta (2007) expuseram ratos Wistar a diferentes tipos de estresse, e analisaram as possíveis alterações no peso do timo e das glândulas supra-adrenais. Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença significativa no peso de tais órgãos, quando comparado o valor do peso absoluto com o valor do peso relativo. Tais dados, além de outros trabalhos, como de Domínguez-Gerpe e Rey-Méndez (2000), demonstraram que a hipertrofia da supra-adrenal bem como a involução tímica estão relacionadas com longa duração e severos protocolos de estímulos, assim, sugere-se que o tempo de tratamento com a EDET associada com a bleomicina atingiu níveis de estresse suficiente para promover alterações.

Entretanto Marin, Cruz e Planeta (2007), abordaram que há diferença na alteração de tais órgãos quando estudado em ratos adultos e ratos adolescentes, sendo estes mais susceptíveis a involução do timo quando expostos a algum tipo de estresse. Como os animais utilizados no presente trabalho eram jovens (3 a 4 meses), segundo Andreollo et al, 2012, pode-se pensar que o recurso

fisioterapêutico, ao provocar a involução do timo, deve ser aplicado com reservas em indivíduos na fase infantil, e jovens. O peso do fígado e do baço não apresentou diferença significativa (tabela 1). O peso das adrenais apresentou um aumento significativo de 40% no grupo BE em relação aos outros grupos. Outros estudos demonstraram que ocorre uma hipertrofia das adrenais quando os animais foram submetidos a exercícios de alta intensidade (ROSA; VAISBERG, 2002; LANA, GONÇALVES; PAULINO, 2006). Neste trabalho o aumento no peso das adrenais pode ser atribuído à atividade desenvolvida pela estimulação, simulando um treinamento específico para a musculatura respiratória, bem como ao estresse provocado pela anestesia diária. O peso corporal foi 22,1% menor no grupo estimulado, e estes resultados corroboram com o estudo de Lana, Paulino e Gonçalves (2006) que observaram uma hipertrofia nas glândulas supra-adrenais após o treinamento de baixa e de alta intensidade, além de uma redução significativa na massa corporal, sem promover alterações significativas no peso do baço. Esta diminuição do peso corporal pode ter relação com a diminuição da gordura periepididimal, pois neste grupo, ela foi 36,5% menor, comparado com o grupo C. Quanto à glicemia, como mostra a Tabela 2, o grupo B apresentou valores maiores do que o grupo controle. O recurso fisioterapêutico utilizado provocou diminuição significativa (27,16%) comparada ao grupo B, e provavelmente esta alteração se dá pelo treinamento físico regular (CIOLAC; GUIMARÃES, 2004).

5. Considerações Finais

Pelos dados obtidos, foi observado redução da glicemia, do peso corporal, peso do timo e da gordura periepididimal com o uso da eletroestimulação. Estes resultados podem ser explicados pelo gasto energético produzido com a atividade desenvolvida diariamente, enquanto o peso das adrenais apresentou um aumento, provavelmente pelo estresse diário da anestesia. Este recurso necessita de maiores estudos experimentais para aplicação em seres humanos, considerando-se principalmente a idade, e o estresse provocado.

Referências Bibliográficas

- BELLER, T.C.; FRIEND, D.S.; MAEKAVA, A. 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.
- CANCELLIERO, K.M.; COSTA, D.; SILVA, C.A. Estimulação diafragmática elétrica transcutânea melhora as condições metabólicas dos músculos respiratórios de ratos. **Rev Bras. Fisioter**, v. 16, n. 10, p. 59-61, 2006.
- CANCELLIERO, K.M. Estimulação elétrica transcutânea (EDET) em ratos com fibrose pulmonar induzida por bleomicina. Tese (Doutorado). PG - Fisioterapia – UFSCar, 2007, 114p.
- CIOLAC, E. G.; GUIMARÃES, G. V. Exercício físico e síndrome metabólica, **Rev Bras Med Esporte**, v. 10, n. 4, p. 319-324, 2004.
- CHINN, I. K.; BLACKBURN, C. C.; MANLEY, N. R.; et al. Changes in primary lymphoid organs with aging. **Semin Immunol**, 2012.
- CRINER, G.J.; TRAVALINE, J.M.; HOLT, G.A.; et al. Variability of electrophrenic diaphragm twitch stimulation over time in normal subjects. **Respir Physiol**, v. 118, n.1, p. 39-37, 1999.
- DOMÍNGUEZ-GERPE, M. L.; REY-MÉNDEZ, M. The thymus from normal to involution or hyperplasia. In: Recent Res Devel Immunology. **Research Signpost**, v. 1, p. 531-540, 1999.
- DOMÍNGUEZ-GERPE, L.; REY-MÉNDEZ, M. Role of pre-T cells and chemoattractants on stress-associated thymus involution. **Scand J Immunol**, v. 52, p. 470-476, 2000.
- FORTI, E. M. P.; IKE, D.; BARBALHO-MOULIM, M.; et al. Effects of chest physiotherapy on the respiratory function of postoperative gastropasty patients. **Clinics**, v. 64, n. 7, p. 683-689, 2009.
- GREEN, R. H.; SINGH, S. J.; WILLIAMS, J.; 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.
- HAMADA, T.; SASAKI H.; HAYASLU, T.; et al. Enhancement of whole body glucose uptake during and after human skeletal muscle low-frequency electrical stimulation. **J Appl Physiol**, v. 94, p. 2107-2112, 2003.
- HONG, J.S.; KO, H.H.; HAN, E.S.; LEE, C.S. Inhibition of bleomycin – induced cell death in rat alveolar macrophages and human lung epithelial cells by ambroxol. **Biochem Pharmacol**, v. 66, n.7, p.1296-1206, 2003.
- LANA, A. C.; GONÇALVES, I. D.; PAULINO, C. A. Influência dos exercícios físicos sobre a massa corporal e o peso relativo de alguns órgãos de ratos Wistar. **Biológico**, v.68, p.253-258, 2006.

- LANA, A C; PAULINO, C. A.; GONÇALVES I. D. Influence of low and high intensity physical exercise on hypernociception threshold and other parameters of rats. **Rev Bras Med Esporte**, v. 12, n. 5, p. 248-254, 2006.
- MARIN, M. T.; CRUZ, F. C.; PLANETA, C. S. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. **Physiol Behav**, v. 90, p. 29-35, 2007.
- NASCIMENTO, P.; AQUIM, E. E. A aplicação da eletroestimulação transcutânea diafragmática em indivíduos normais. **Fisio Brasil**, v. 1, n. 1, 15-18, 1990.
- RAFACHO, A.; ROMA, L. P.; TABAGA, S. R.; et al. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 85, p. 536-545, 2007.
- ROSA, L. P. B. C.; VAISBERG, M. W. Influências do exercício na resposta imune. **Rev Bras Med Esporte**, v. 8, p.167-172, 2002.
- SELYE, H. Thymus and adrenals in the response of the Organism to injuries and intoxications. **Brit J Exp Pathol**, v. 17, n. 3, p:234-248, 1936.
- SLEIJFER, S. Bleomycin-induced pneumonitis. **Chest**, v. 120, n. 2, p. 617-624, 2001.
- STEVENSON, C. S.; KOCH, L. G.; BRITTON, S. L. Aerobic capacity, oxidant stress, and chronic obstructive pulmonary disease. A new take on an old hypothesis. **Pharmacol Ther**, v. 313, n. 110, p. 71-82, 2006.

Anexos

Tabela 2. Valores de média e dp da glicemia dos ratos do grupo bleomicina e do grupo bleomicina + EDET.

Grupos experimentais	Glicemia (mg/dL)
Controle	116,1 ± 9,6
Bleomicina	148,00 ± 17,52
Bleomicina + EDET	107,83 ± 19,18*

p < 0,05; *difere significativamente do grupo bleomicina; mg/dl = miligramas por decilitro; dp: desvio padrão

Tabela 1. Média e dp do peso do timo, fígado, baço, adrenais e gordura periepididimal e do peso corporal dos ratos do grupo controle, grupo bleomicina e grupo bleomicina+EDET.

Pesos	Controle	Bleomicina	Bleomicina + EDET
Timo (g)	0.42 ± 0.10	0.45 ± 0.11	0.21 ± 0.03**
Adrenais (g)	0.05 ± 0.005	0.05 ± 0.007	0.072 ± 0.008**
Fígado (g)	9.83 ± 1.35	9.32 ± 1.22	9.85 ± 0.37
Baço (g)	0.56 ± 0.10	0.59 ± 0.10	0.55 ± 0.06
^a Gordura periepididimal (g)	2.50 (2.19 - 2.79)	2.45 (1.85 - 2.96)	1.74 (1.55 - 1.82)*
Peso corporal (g)	310,86 ± 34,46	269,88 ± 19,36*	242,00 ± 10,70*

p < 0,05; * diferença significativa entre o grupo controle e grupo bleomicina + EDET; # diferença significativa entre o grupo bleomicina e o grupo bleomicina + EDET; g = gramas; dp = desvio padrão; ^a Valores expressos em mediana (1ºquartil – 3º quartil).