

**17º Congresso de Iniciação Científica****ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE PULMÃO DE RATOS TRATADOS COM BLEOMICINA E  
COM ESTIMULAÇÃO DIAFRAGMÁTICA ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA****Autor(es)**

---

LAISA ANTONELA DOS SANTOS

**Orientador(es)**

---

MARIA LUIZA OZORES POLACOW

**Apoio Financeiro**

---

PIBIC/CNPQ

**1. Introdução**

---

A bleomicina é um antibiótico citotóxico utilizado por pacientes portadores de carcinoma que tem como efeito colateral mais grave a toxicidade pulmonar, a qual ocorre em 10% dos pacientes, sendo que em 1%, a pneumonite não-específica induzida evolui para fibrose pulmonar (BRISTOL-MYERS SQUIBB®). Segundo Hagiwara et al. (2000), o modelo de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina em ratos é uma ferramenta útil para avaliar os mecanismos gerais da fibrose, principalmente aqueles mediados por radicais livres de oxigênio.

Vários estudos tem mostrado a importância da utilização da estimulação diafragmática elétrica transcutânea (EDET) em diversas patologias e em situações nas quais há a disfunção ou o desuso muscular, como no estudo de Green et al. (2001), onde pacientes submetidos a treinamento muscular obtiveram melhora da força e função muscular respiratória, além do incremento da oxigenação, ventilação, contribuindo para redução do tempo de hospitalização.

Baseado nisto, Cancellero et al (2006) adaptou a EDET para a aplicação em ratos com fibrose pulmonar gerada pela bleomicina e seus resultados reiteram a eficácia da EDET enquanto promotor de melhora nas 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 provocada pela bleomicina, não foi estudada, razão da proposição do presente trabalho como continuidade da proposta.

Assim, aventou-se a hipótese de que a EDET poderia ser um recurso complementar na área da fisioterapia respiratória, para minimizar algum efeito deletério desencadeado pela bleomicina.

**2. Objetivos**

---

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da bleomicina e da sua associação com a EDET sobre a densidade da área alveolar de tecido pulmonar de ratos.

**3. Desenvolvimento**

---

Após aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP nº 754-2), ratos Wistar foram divididos em 3 grupos (n=5): grupo controle (C), tratado com bleomicina (B) via intratraqueal: 2,5mg/Kg peso corporal em dose única; tratado com B+EDET (f= 50 Hz, TON=2 seg., TOFF= 2 seg., T= 0,4 ms, i= 5.0 mA, t= 20 min., período= 7 dias). Cinco fragmentos de pulmão foram fixados em solução tamponada de formol (10%) e processados para inclusão em paraplast e coloração em HE. Cinco cortes de 6µm foram obtidos por segmento e de cada corte foram selecionadas 5 áreas padronizadas, num total de 125 imagens por animal. Nestas áreas foram obtidas a densidade de área alveolar, por meio da planimetria por contagem de pontos, realizada com o software Image Pró-plus 4.0 (Media Cybernests®) segundo Mathieu et al. (1981) e Mandarin de Lacerda (1994). Utilizou-se uma grade com 88 pontos de intersecção, sendo contadas as intersecções coincidentes com a área alveolar. Para a análise estatística, foi aplicado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, o qual foi positivo e em seguida foi utilizado o teste paramétrico ANOVA, seguido do teste de Tukey, considerando  $p < 0,05$ .

#### 4. Resultado e Discussão

---

A bleomicina promoveu redução significativa ( $p < 0,001$ ) de 38,43% na densidade da área alveolar quando comparado ao grupo controle (Tabela 1).

Este resultado confirma vários trabalhos da literatura, que apontam fibrose provocada pela bleomicina, justificando que este efeito se deve à produção de radicais livres, levando à apoptose (BORZONE et al., 2001; XU et al., 2003; MARTINEZ et al., 2008).

Pela tabela 1, nos pulmões do grupo Bleomicina + EDET houve um aumento da área alveolar de 43,45% ( $p < 0,01$ ) quando comparado ao grupo Bleomicina, sendo que não houve diferença ( $p > 0,05$ ) quando comparado ao grupo Controle.

Nas lâminas histológicas de pulmão do grupo de animais tratados por bleomicina observam-se espessamento expressivo dos septos interalveolares, caracterizado pelo infiltrado inflamatório, reduzindo a área de troca gasosa. Já no grupo Bleomicina + EDET as imagens de pulmão mostram-se semelhantes ao grupo controle, com septos interalveolares estreitos e porções aéreas definidas (Figura 1). Como os resultados de Cancellero et al (2006) reiteraram a eficácia da EDET enquanto promotor de melhora nas condições energéticas da musculatura respiratória, possivelmente, com o fortalecimento dos músculos respiratórios pode-se inferir que há aumento do fluxo sanguíneo pulmonar, o que facilita a remoção dos radicais livres provocados pela bleomicina.

Neste estudo foi possível quantificar a perda de área alveolar provocada pela bleomicina e pela primeira vez, quantificar a recuperação da área alveolar com a utilização da EDET, confirmando a hipótese inicial do estudo.

#### 5. Considerações Finais

---

O tratamento com bleomicina promoveu espessamento dos septos interalveolares e consequentemente redução da área alveolar, porém o recurso fisioterapêutico EDET mostrou-se eficaz, conseguindo reverter os efeitos deletérios pulmonares promovidos pelo quimioterápico.

#### Referências Bibliográficas

---

BORZONE, G.; et al. Bleomycin-Induced Chronic Lung Damage Does Not Resemble Human Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, v. 163, p. 1648 – 1653, 2001.

BRISTOL-MYERS SQUIBBÒ FARMACÊUTICA LTDA. – BlenoxaneÒ – Sulfato de bleomicina.

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. 10, n.1, p. 59-61, 2006.

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.

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.

MATHIEU, O. et al. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. J Microsc, v. 121, p. 75-88, 1981.

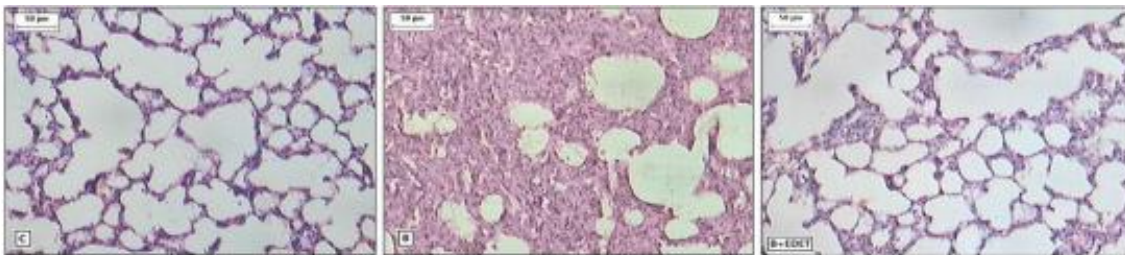
XU, Y.D. et al. Release of biologically active TGF-beta by alveolar epithelial cells results in pulmonary fibrosis. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. v.285, p. 527-53, 2003.

## Anexos

**Tabela 1. Densidade da área alveolar (%) dos grupos (n=5) Controle; Bleomicina e Bleomicina + EDET.**

Grupos	Média±dp
Controle	45,12±2,97
Bleomicina	27,78±4,61 *
Bleomicina + EDET	39,85±7,33 #

Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov: positivo  
ANOVA + Tukey,  $p > 0,05$ ; \* comparado ao Controle e # comparado ao Bleomicina



**Figura 1.** Fotomicrografias de pulmão dos grupos: Controle (C), tratado com Bleomicina (B) e tratado com Bleomicina + EDET (B+EDET). Observar a fibrose e diminuição do espaço alveolar do grupo B e a recuperação destes espaços no grupo tratado por EDET (Hematoxilina - Eosina, 10x).