



18º Congresso de Iniciação Científica

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO DIAFRAGMÁTICA ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA (EDET) NO PULMÃO DE RATOS TRATADOS COM BLEOMICINA. ANÁLISE HISTOMÉTRICAS E HISTOQUÍMICAS

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 localizado principalmente na cabeça e pescoço, pele pênis, colo uterino, vulva, testículo, linfoma (Doença de Hodgkin e linfoma não Hodgkin) e derrame pleural maligno (BRISTOL- MYERS SQUIBB®).

Segundo Sleifer (2001) o sulfato de bleomicina é o agente antineoplásico que causa fibrose pulmonar e seu efeito tóxico tem sido utilizado em modelos experimentais em animais (LAZO et al., 1990). No entanto, o mecanismo envolvido na indução dessa doença não tem sido completamente entendido.

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.

Estudos em humanos já padronizaram os parâmetros para utilização da EDET (GEDDES et al., 1985; 1990; GEDDES e SIMMONS, 1991). 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.

Assim, 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.

Baseado nisto, Cancellero (2007) adaptou a EDET para aplicação em ratos, desenvolvendo um protocolo similar ao utilizado no ser humano, mais especificamente com relação à frequência da corrente, pois na literatura constam trabalhos de estimulação elétrica em diafragma somente relacionados a eletrodos subcutâneos, sendo implantados no ponto motor ou mesmo no nervo frênico. Diante disto, a autora optou pela estimulação elétrica por meio de eletrodo transcutâneo, comumente utilizada pela fisioterapia.

Além do objetivo de propor um protocolo de EDET aplicada em ratos, houve também a inserção de uma condição patológica pulmonar, especificamente a fibrose pulmonar, gerada por um quimioterápico, a bleomicina.

Assim, aventa-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

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

3. Desenvolvimento

Foram utilizados ratos Wistar, com 3 a 4 meses, alimentados com ração e água “ad libitum”, e divididos em 3 grupos (n=5): tratados com bleomicina, tratados com bleomicina associado à EDET e controle.

Este trabalho foi aprovado pela comissão de ética na experimentação animal – CEEA-IB-UNICAMP sob o protocolo nº 754-2.

O tratamento com bleomicina foi realizado por uma dose única de sulfato de bleomicina (Blenoxame® - BRISTOL- MYERS SQUIBB) na concentração de 2,5mg/kg de peso corporal segundo a proposta de Beller et al (2004) pela via intratraqueal e depois de 7 dias os animais foram sacrificados.

Para a aplicação da EDET os animais foram anestesiados e a região anterior do tórax tricotomizada para garantir uma maior efetividade da estimulação e do posicionamento dos eletrodos. A estimulação elétrica foi realizada diariamente por 20 minutos durante 7 dias, 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 milisegundos (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. Esta região é próxima aos ramos laterais do nervo frênico, que terminam na região lateral do diafragma.

As peças (pulmão) obtidas foram processadas para as análises histopatológicas. De cada animal foram retirados 5 fragmentos de pulmão, fixados em solução tamponada de formol a 10% e posteriormente processados para inclusão em paraplast e coloração em Hematoxilina e Eosina. Cinco cortes de 6µm de espessura foram obtidos de cada segmento e de cada corte selecionadas 5 áreas captadas por um microscópio de luz com objetiva de 40x foi adaptado com uma ocular reticulada (Carl Zeiss, K 10x/18) e por meio desta foram computados o número de fibroblastos e de leucócitos presentes nos septos interalveolares em 10 áreas de 250 µm², em cada grupo experimental, totalizando 100 áreas por animal.

Foi realizada a análise estatística pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, sendo positiva a amostra, foi realizado o teste paramétrico de ANOVA seguido do teste de Tukey, com nível de significância de $p < 0,05$.

4. Resultado e Discussão

A partir das análises realizadas pode-se observar um aumento significativo ($p < 0,05$) no número dos fibroblastos no grupo tratado com a Bleomicina em relação ao grupo controle, enquanto o grupo tratado com Bleomicina + EDET, apresentou uma redução significativa ($p < 0,01$) no número dos fibroblastos em relação ao grupo Bleomicina, voltando aos valores normais do grupo Controle (Tabela 1). Em relação à presença de leucócitos, nossos resultados mostraram que o grupo Bleomicina apresentou um aumento significativo ($p < 0,001$) destas células de defesa, em comparação ao grupo Controle. Já o grupo tratado com a Bleomicina + EDET apresentou uma redução significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo Bleomicina (Tabela 2).

Observou-se no grupo bleomicina um espessamento dos septos interalveolares e um aumento do número de células: fibroblastos e leucócitos. O grupo B + EDET se mostrou semelhante ao grupo C, com septos interalveolares estreitos e poucas células com características fibroblásticas, como mostra a Figura 1.

Pelo efeito tóxico com consequente formação de fibrose, a bleomicina foi adotada como modelo experimental (BORZONE et al., 2001, XU et al., 2003, FUJITA et al., 2008, MARTINEZ et al., 2008), pois seu mecanismo de ação induz a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) que promove a apoptose e/ou ao aumento da regulação de Fatores transformadores de crescimento - TGF-?. Este fator (TGF-?) é uma das mais importantes citocinas envolvida na fibrose pulmonar (AKOI et al., 2005).

Os resultados do presente estudo e de um trabalho anterior do mesmo grupo de pesquisa confirmaram este efeito da bleomicina. Nas lâminas histológicas de pulmão dos animais tratados com bleomicina, foi observado um espessamento expressivo dos septos

interalveolares e quando foi quantificado por métodos histomorfométricos, foi observada redução significativa de 38,4% na densidade de área alveolar, com consequente redução da área de troca gasosa. Provavelmente, isto se deve em parte ao infiltrado celular nos septos interalveolares do pulmão de ratos tratados com bleomicina, pois houve aumento significativo do número de leucócitos (201,8%) e de fibroblastos (18,4%). Entretanto o grupo estimulado se assemelhou ao número de células presentes no grupo controle. No presente trabalho a análise morfométrica do pulmão de ratos tratados com bleomicina e EDET mostrou redução significativa dos efeitos deletérios da bleomicina, com recuperação de 43,45% da densidade de área alveolar, além da inibição do aumento do número de fibroblastos e leucócitos, mostrando o efeito benéfico do tratamento, mesmo não sendo farmacológico.

Apesar de não haver estudos relacionando a estimulação elétrica com a fibrose pulmonar, possivelmente, com a contração muscular promovida pela EDET na musculatura respiratória, tendo em vista que metabolicamente os músculos respiratórios são beneficiados com este recurso, conforme já citado em estudos anteriores, pode-se sugerir que houve aumento do fluxo sanguíneo, facilitando a remoção dos ROS provocados pela bleomicina, e assim impedindo o processo inflamatório, observado no grupo tratado somente com bleomicina. Esta sugestão é reforçada pela observação dos dados histopatológicos apresentados, em que o tecido pulmonar do grupo que recebeu o tratamento com a EDET apresentou número de fibroblastos e de leucócitos semelhantes ao grupo controle.

5. Considerações Finais

Diante do exposto, conclui-se que o tratamento com bleomicina promoveu espessamento dos septos interalveolares e consequentemente redução da área alveolar, com aumento das células inflamatórias fibroblastos e leucócitos, porém o recurso fisioterapêutico EDET aplicado precocemente conseguiu reverter os efeitos deletérios pulmonares promovidos por este fármaco.

Referências Bibliográficas

AKOI, F.; et al. Attenuation of bleomycin induced fibrosis by Follistatin. *Am J Resp Crit Care Med*, v. 172, 713-720, 2005.

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, 3047-3052, 2004.

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 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.

FUJITA, M.; et al. Biphasic effects of free radical scavengers against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v. 21, p. 805-811, 2008.

GEDDES, L.A.; VOORHEES, W.D.; BABBS, C.F. Electroventilation, *Proc. 5th Purdue Conf. CPR & Defibrillation. Amer Journ Emerg Med*, v. 3, n. 4, 337-339. 1985.

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, 103-108, 1990.

GEDDES, L.A.; SIMMONS, A. Artificial respiration in the dog by percutaneous bilateral phrenic nerve stimulation. *Amer Journ Emerg Med*, v. 9, p. 527-529, 1991.

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.

LAZO, J.S.; et al. Bleomycin: a pharmacologic tool in the study of the pathogenesis of interstitial pulmonary fibrosis. *Pharmacol*

Ther, v. 47, n. 3, p. 347-358, 1990.

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.

SLEIJFER, S. Bleomycin-induced pneumonitis. Chest, v. 120, n. 2, p. 617-624, 2001.

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

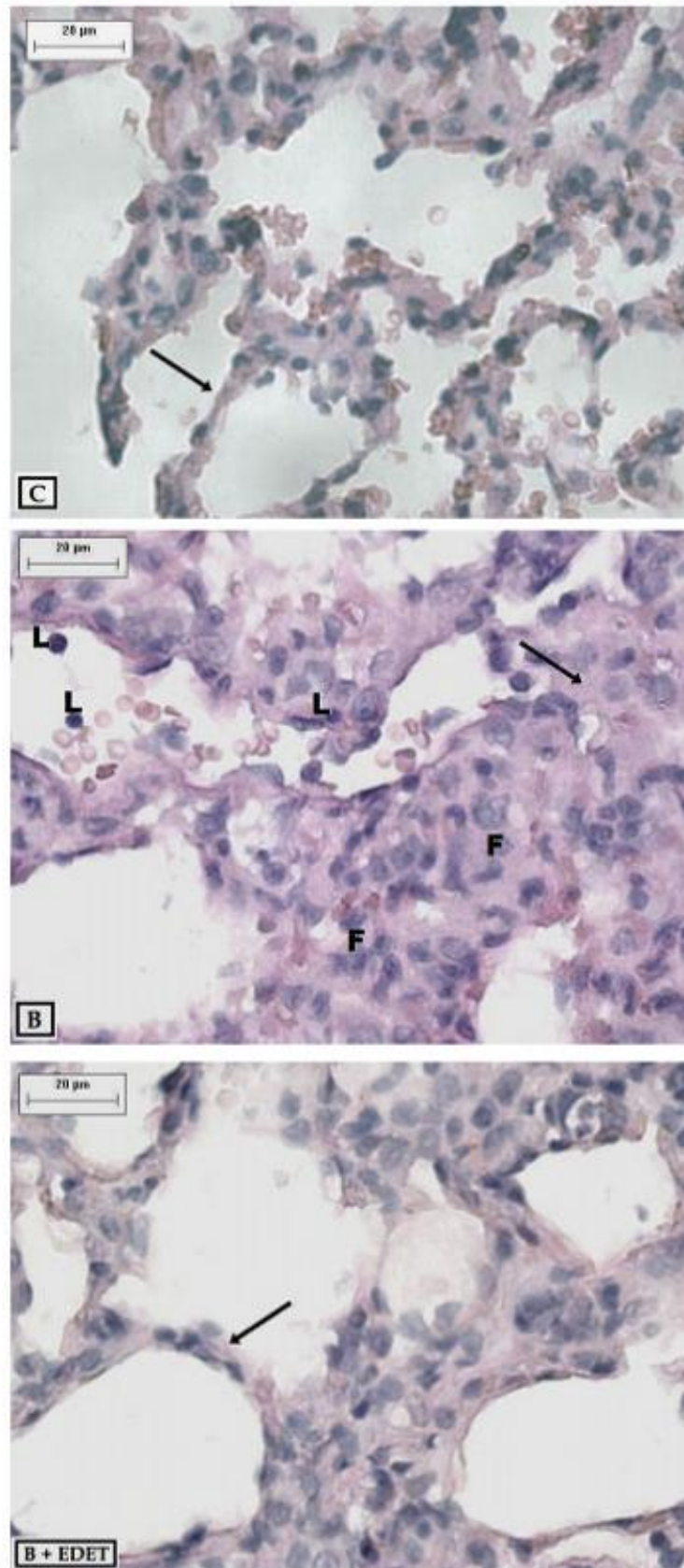


Figura 1. Fotomicrografias de pulmão dos grupos: controle (C), tratado com bleomicin (B) e tratado com bleomicina + EDET (B+EDET). Observar o aumento dos fibroblastos leucócitos, consequente espessamento dos septos interalveolares grupo B e semelhança entre o grupo B+EDET e o grupo C (Hematoxilina-Eosina, 40x).

Tabela 1. Número de fibroblastos por área reticular dos grupos (n=5) Controle; Bleomicina e Bleomicina + EDET.

Grupos	Média±dp
Controle	567,2±44,1
Bleomicina	672±53,7*
Bleomicina + EDET	501±79,3 ##

*p<0,05 comparado com o grupo controle e ## p<0,01 comparado com o grupo Bleomicina.

Tabela 2. Número de leucócitos por área reticular dos grupos (n=5) Controle; Bleomicina e Bleomicina + EDET.

Grupos	Média±dp
Controle	53,4±16,7
Bleomicina	160±43,7 ***
Bleomicina + EDET	88,4±20,8 ##

***p<0,001 comparado com o grupo controle e ## p<0,01 comparado com o grupo Bleomicina.