

Fotobiomodulação experimental na prevenção de enfisema pulmonar

Experimental photobiomodulation in prevention of lung emphysema

Rafael Leite Dantas¹; Jivago Gentil Moreira Pinto¹; Reijane Oliveira Lima¹; Raurys Alencar de Oliveira²; Wellington dos Santos Alves³

¹ Graduandos em Fisioterapia – Uespi. Teresina, PI – Brasil.

² Doutorando em Engenharia Biomédica e Professor para o curso de Fisioterapia – Novafapi e Uespi. Teresina, PI – Brasil.

³ Mestre em Bioengenharia e Professor de Biologia Celular e Genética para os cursos de Fisioterapia – FSA e da Uespi. Teresina, PI – Brasil.

Endereço para correspondência

Rafael Leite Dantas
Av. Rio Poty, 2061 – Cond. Ilha das Canárias, Apto. 704, Bairro Horto Florestal
64049-410 – Teresina, PI [Brasil]
ozdantas@hotmail.com

Resumo

Introdução: A DPOC é hoje um grande desafio para a saúde pública, sendo a quarta causa de morte no mundo e com projeções de torna-se a terceira. **Objetivo:** Avaliar a ação anti-inflamatória do *laser* na preservação da estrutura alveolar e diminuição dos neutrófilos. **Método:** Utilizaram-se cinco grupos de oito animais: grupo controle; grupo cânula; grupo *laser*; grupo DPOC (recebeu instilação de papaína) e grupo DPOC+*laser*. Para análise dos resultados foram realizados LBA e histopatológico. **Resultados:** Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O LBA demonstrou um aumento significativo no número de neutrófilos no grupo DPOC, quando comparado ao controle e ao DPOC+*laser*. Na análise histopatológica, o DPOC apresentou elevado grau de hialinização, congestão e colapso alveolar, o que não foi encontrado nos demais grupos. **Conclusão:** Os efeitos fotobiomoduladores do *laser* se mostraram eficazes na prevenção do enfisema pulmonar.

Descritores: DPOC; *Laser*; Neutrófilos.

Abstract

Introduction: COPD is now a major challenge for public health, it is the fourth leading cause of death in the world and projected to be the third. **Objective:** To assess the anti-inflammatory action of the *laser* in the preservation of alveolar structure and decreases in neutrophils. **Methods:** We used five groups of eight animals: control group, group cannula; laser group, the COPD group (received papain instillation) and COPD + laser. For analysis of results were performed BAL and histopathological. **Results:** Results were submitted to analysis of variance (ANOVA). BAL showed a significant increase in the number of neutrophils in the COPD group compared to the control group and the COPD+laser group. In the histopathological analyses, COPD group showed a high degree of hyalinization, congestion and alveolar collapse, which was not found in other groups. **Conclusion:** Photobiomodulation effects of laser proved effective in the prevention of lung emphysema.

Key words: COPD; Laser; Neutrophils.

Introdução

O enfisema pulmonar é uma doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) que se caracteriza pela dilatação dos espaços aéreos distais aos bronquíolos terminais¹. Essa dilatação ocasiona progressiva limitação do fluxo aéreo, o que gera incapacidades físicas e piora da qualidade de vida².

A DPOC é hoje um grande desafio para a saúde pública³. No mundo, estima-se que é a quarta maior causa de morte⁴. Na América Latina, as mortes atribuídas à doença aumentaram 65% na última década³. No Brasil, não se conhece a sua real prevalência devido aos diferentes critérios diagnósticos⁵, mas nos Estados Unidos da América (EUA) ela é a quarta maior causa de morte com estimativa para tornar-se a terceira em 2020⁶.

A aparência histológica clássica do enfisema é a perda das paredes alveolares com consequente destruição de porções do leito capilar. As pequenas vias aéreas (inferiores a 2 mm de diâmetro) se mostram estreitas, tortuosas e numericamente reduzidas. Além disso, elas possuem paredes finas e atrofiadas^{1,2}.

Uma hipótese atual para o desenvolvimento do enfisema é a liberação pelos neutrófilos de grandes quantidades de enzima lisossomal elastase. Essa liberação causa a destruição da elastina e do colágeno tipo IV, que são fundamentais para a estruturação e a integridade alveolar¹. A elastase tem efeito similar ao da enzima proteolítica extraída da fruta e seiva da papaia (*Carica papaya*), por esse motivo a papaína é utilizada para o desenvolvimento experimental do enfisema pulmonar^{7,8}.

O fumo é um fator importante para o desenvolvimento do enfisema, pois estimula os macrófagos a liberarem substâncias quimioatrativas de neutrófilos, como o C5a, e reduz a atividade dos inibidores da elastase. Além disso, exacerba a marginação de leucócitos no pulmão¹.

A neovascularização e a rápida epitelização são importantes na reestruturação do pulmão enfisematoso. Um dos meios atualmente

conhecidos de conseguir neovascularização e rápida epitelização é utilizando o efeito fotobiomodulador do *laser* de baixa potência⁹⁻¹². Os fótons desse *laser* geram energia química e cinética no interior da célula com baixa produção de calor^{13,14}, o que aumenta a síntese de ATP e conduz para normalização da função celular. Cálcio é liberado das mitocôndrias, devido à intensificação do seu gradiente protônico dentro do citoplasma, o que gera reparação, migração e proliferação celular, síntese de ácido ribonucleico (sigla em Inglês, RNA, *ribonucleic acid*), *deoxyribonucleic acid* (DNA) e proteínas¹⁵. Além disso, ocorre a redução de mediadores inflamatórios, como o *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), o que reduz a inflamação e aumenta a capacidade mecânica do diafragma¹⁵.

Muitas doenças pulmonares são ocupacionais e relacionadas à poluição do ar. A utilização de compostos inorgânicos, como carvão mineral e sílica, em diversos setores industriais e a maior quantidade dos poluentes atmosféricos tem levado ao aumento das doenças pulmonares, como as ambientais e as obstrutivas¹. Diversos estudos vêm sendo realizados para obtenção de êxito no tratamento desse tipo de enfermidade. Tem-se investido em exames diagnósticos mais precoces e em formas alternativas de tratamento. Um tipo de tratamento não medicamentoso que tem se mostrado promissor é o realizado pelo *laser* de baixa potência. Com o objetivo de avaliar esse tratamento na prevenção do enfisema pulmonar, realizou-se este ensaio experimental.

Metodologia

O estudo foi desenvolvido no laboratório de histopatologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Piauí (CCS/UESPI), no período de agosto de 2010 a março de 2011 e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Facid, protocolo n.º. 204/10.

Cânulas na traqueia foram utilizadas como via de acesso ao pulmão. Para determi-

nar o tamanho da cânula e o melhor local para a incisão, dois animais foram sacrificados com tiopental -300 mg/kg, ip para dissecação traqueal. Os procedimentos de anestesia foram realizados com ketamina -100 mg/kg, ip e xilazina -20 mg/kg, ip. Após a anestesia foi feita uma incisão longitudinal na região cervicoventral, assim a traqueia foi exposta (Figura 1-b) e canulada (Figura 2-a). A cânula foi suturada interna e externamente para que o animal não realizasse a decanulação e nem causasse lesão de traqueia.

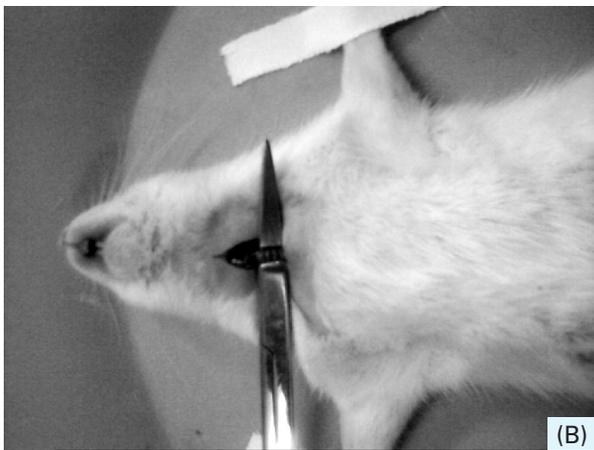


Figura 1: (a) – Óculos de proteção, laser acoplado a fibra óptica (detalhe) e estojo com fibras ópticas descartáveis. (b) – Localização da traqueia

Foram utilizados 42 ratos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar) machos, com três meses de vida e peso médio de $300 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$ provenientes do Biotério do CCS/UESPI. Foram forma-

dos cinco grupos de oito animais, divididos da seguinte forma: grupo controle; grupo cânula; grupo laser; grupo DPOC; grupo DPOC + laser. Os animais componentes de cada grupo foram tratados da seguinte forma: no grupo controle, não receberam nenhum dos tratamentos mencionados; no cânula, somente a cânula; no laser, foram apenas irradiados; no DPOC, receberam papaína e, no grupo DPOC + laser, os ratos foram irradiados após a instilação de papaína.

A indução do enfisema pulmonar foi realizada por meio de uma única instilação de solução de papaína. A dosagem foi estabelecida modificando-se o determinado por Fusco⁸ em seu modelo experimental. Foram instilados $0,05$ ml por animal em uma concentração que assegurasse $2,5$ mg/kg (correspondente a $0,75$ mg de papaína por animal), pela traqueostomia, em infusão, por aproximadamente dois minutos.

Para a estratégia de tratamento do enfisema pulmonar, foi utilizado laser 660 nm MM OPTICS (Figura 1-a) e dose de 7 J/cm^2 , o tempo foi calculado automaticamente pelo aparelho por meio de seletores de densidade de potência. Para a irradiação do laser, foi utilizada fibra óptica plástica MMO $1 \times 0,4 \text{ mm}$ (Figura 1-a). Nos grupos laser e DPOC+laser, o laser foi aplicado acoplado à cânula traqueal de modo que a fibra ótica flexível de sua extremidade ultrapassasse a sua angulação (Figura 2-b). Nos dois grupos, os animais foram irradiados uma vez ao dia, pela manhã, durante cinco dias consecutivos iniciando 24 horas após a instilação da papaína. Esse início rápido do tratamento objetivou prevenir alterações, na maioria irreversíveis, do enfisema avançado.

Para a quantificação dos neutrófilos, realizou-se lavado broncoalveolar (LBA) no sexto dia do experimento. Quatro animais de cada grupo foram sacrificados e foi feita uma nova incisão longitudinal na região cervicoventral para exposição e canulação da traqueia com o tubo flexível de um escalpe. Foram ejetados 20 ml de PBS (Solução Salina Fosfatada Tamponada) no pulmão e aplicada uma massagem local, posteriormente foram aspirados 10 ml de secreção

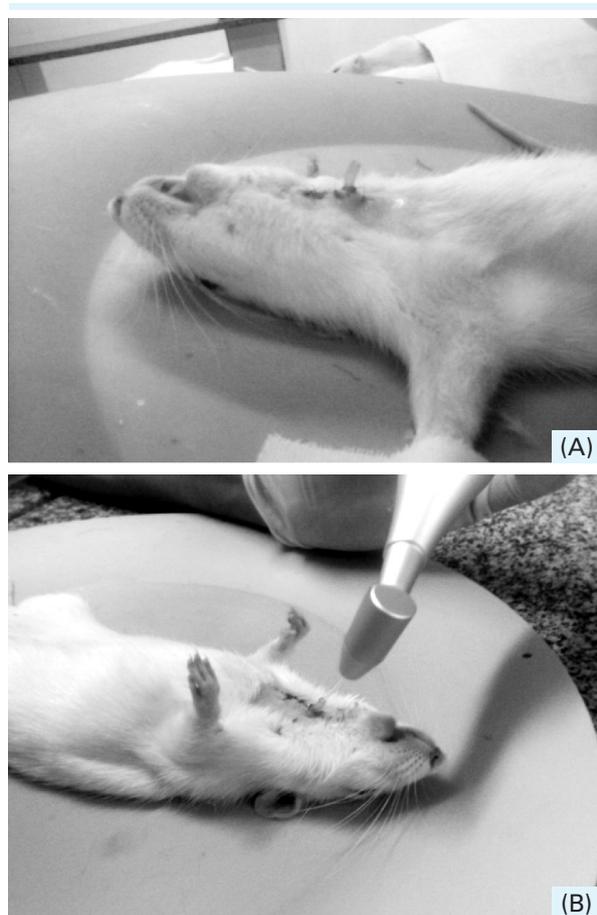


Figura 2: (a) – Wistar traqueostomizado. (b) – Demonstração da aplicação do laser em um animal anestesiado

pulmonar. O LBA obtido foi centrifugado por 20 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular aspirado por pipeta para a realização do esfregaço, que foi corado com o método May Grnwald – Giensa. A contagem das células totais das lâminas foi realizada em câmara de Neubauer¹⁶.

No mesmo dia do LBA, foi realiza a necropsia dos pulmões dos quatro animais restantes de cada grupo. Para a conservação, utilizou-se formol a 10%. Os pulmões tiveram seus lóbulos separados, cortados com espessura de 5 µm, corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisados em microscópio óptico. Para análise histopatológica, considerou-se o grau de hialinização, congestão e colabamento alveolar.

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, em seguida, ao teste Duncan.

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o GraphPad Software V. 4, GraphPad Instat-TM (2005). Os resultados foram expressos como a média ± erro-padrão da média (EPM). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados e discussão

Os resultados encontrados, em termos de neutrófilos no LBA e presença de alterações histopatológicas, estão demonstrados na Figura 3 e na Tabela 1.

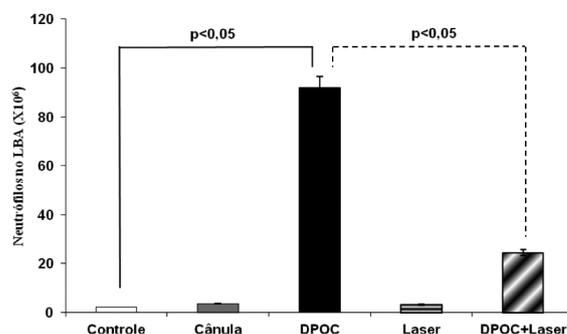


Figura 3: Contagem de neutrófilos no LBA de ratos. ANOVA seguida de Duncan

Tabela 1: Análise histopatológica dos grupos estudados

Grupos Achados	Hialinização	Congestão	Colabameto alveolar
Controle	-	-	-
Cãnula	-	-	-
DPOC	+++	+++	+++
Laser	-	-	-
DPOC+Laser	+	+	+

- (Ausente); + (Discreto); ++ (Moderado); +++ (Acentuado).

Dados do LBA (Figura 3) mostraram uma diferença significativa ($p < 0,05$) no número de neutrófilos, quando comparados os grupos DPOC, DPOC+laser e controle. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo de Alves¹⁶, realizado com 30 ratos divididos em três

grupos, dos quais dois foram expostos à fumaça de cigarro durante 45 dias, e um deles foi tratado com *laser* 670 nm.

Verifica-se que, em relação ao controle, o número de neutrófilos é bem mais abundante no DPOC, representando 920 x 20, o que indica a presença de inflamação, e no grupo tratado com *laser* esse valor reduz para 250 x 20, mostrando que o *laser* exerceu função anti-inflamatória ao proporcionar a redução dessas células, pois entre os grupos DPOC e DPOC+*laser*, a redução foi significativa ($p < 0,05$). Os neutrófilos são as células mais encontradas no LBA de pacientes com DPOC^{17, 18}.

A Tabela 1 demonstra que o grupo DPOC apresentou acentuado grau de hialinização, congestão e colapso alveolar. Em contrapartida, o grupo DPOC+*laser* apresentou apenas discretamente tais achados. Esses resultados se assemelham aos encontrados por Oliveira¹⁹ ao realizar o tratamento de ratos com DPOC utilizando *laser* 904 nm, em que a análise histopatológica no grupo DPOC demonstrou um enfisema acentuado, áreas de atelectasias e destruição das paredes alveolares e a do grupo tratado mostrou uma regressão de enfisema acentuado para discreto.

Dados do LBA e da análise histopatológica demonstram, ainda, que a presença da cânula não ocasionou ação inflamatória significativa, pois os resultados encontrados são semelhantes as do grupo controle. Outro resultado semelhante ao controle foi o encontrado no grupo *laser*. Isso ocorre porque é necessário que o tecido biológico esteja de alguma forma em desequilíbrio homeostático, ou seja, alguns autores relatam que o *laser* de baixa potência não tem efeito sobre células ou tecidos que não possuem algum tipo de alteração fisiopatológica²⁰.

A ação anti-inflamatória do *laser* pode ser facilmente observada ao analisar-se as fotos da análise histopatológica (Figura 4). Verifica-se uma área de contato expressivamente maior no grupo tratado e diminuição da congestão, o que otimiza de maneira significativa a função res-

piratória. Essa resposta anti-inflamatória ocorre porque o *laser* atua inibindo a ação dos IL-1 β e TNF- α , o que interrompe a quimiotaxia celular para o pulmão²¹, principalmente na fase inicial do processo inflamatório²². Essa resposta do fotobiomodulador também foi verificada por vários outros autores²³⁻³⁰.

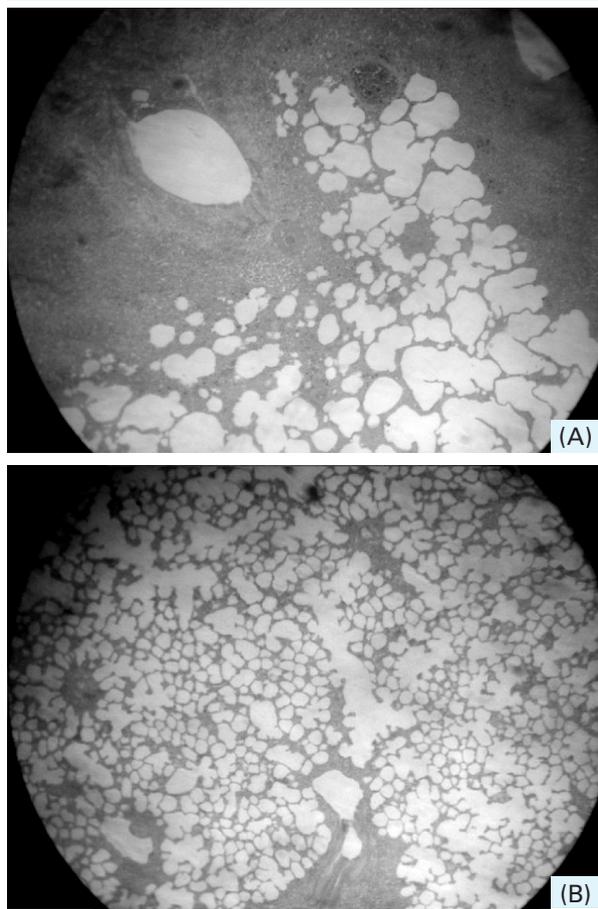


Figura 4: Lâminas com coloração de HE com aumento de 5x10. (a) Grupo DPOC (aumento dos espaços alveolares, colapso alveolar, congestão, hialinização e presença de células inflamatórias); (b) – Grupo DPOC+*Laser*

Conclusão

Tendo por base as análises realizadas, verifica-se que os efeitos fotobiomoduladores do *laser* se mostraram eficazes na prevenção do enfisema pulmonar.

Referências

- West JB. Fisiopatologia pulmonar. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.
- Machado MGR. Bases da fisioterapia respiratória. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
- Meneses AMB. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the platino study in São Paulo, Brazil. *Cad Saúde Pública*, Rio de Janeiro. set-out/2005;21(5):1565-73.
- Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Sep 15;176(6):532-55. Epub 2007 May 16.
- Bagatini E, Jardim J. R. B, Stirbulov R. Doença pulmonar obstrutiva crônica ocupacional. *J Bras Pneumol*. 2006;32(Supl 1):S35-S40.
- Mapel DW, Dutro MP, Marton JP, Woodruff K, Make Barry. Identifying and characterizing COPD patients in US managed care. A retrospective, cross-sectional analysis of administrative claims data. *BMC Health Services Research*. 2011; Feb 23; doi:10.1186/1472-6963-11-43.
- Gross P, Bajak MA, Tolker E, Kaschak M. Enzymatically produced pulmonary emphysema: a preliminary report. *J Occup Med* 1964; 6: 481-3.
- Fusco LB, Pêgo-Fernandes P M, Xavier AM, Pazetti R, Rivero DHFR, Capelozzi VL, Jatene FB. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo. *J Pneumol*. 2002 jan-fev;28(1).
- Dall Agnol MA, Nicolau RA, Liam CJ, Munin E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med Sci*. 2009;24(6):909-16.
- Bourguignon-Filho AM, Feitosa ACR, Beltrão GC, Pagnoncelli RM. Utilização do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização tecidual. Revisão de literatura. *Rev Port Estomatol Cir Maxilofac*. 2005;46:37-43.
- Rabelo SB, Villaverde AB, Nicolau RA, Salgado MAC, Melo MS, Pacheco MTT. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*. 2006;24(4):474-9.
- Medeiros JL, Nicolau RA, Nicola EM, Dos Santos JN, Pinheiro AL. Healing of surgical wounds made with lambda 970-nm diode laser associated or not with laser phototherapy (lambda 655 nm) or polarized light (lambda 400-2000 nm). *Photomed Laser Surg*. 2009;26.
- Rocha Júnior AM, Vieira BJ, Andrade LCF, Aarestrup FM. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contribution of in vitro and in vivo experimental studies. *J Vasc Bras*. 2007;6(3):258-66.
- Peng Q, Juzeniene A, Chen J, Svaasand L, Warloe T, Giercksky KE et al. Lasers in medicine. *Rep Prog Phys*. 2008;71:1-28.
- Aimbire F, Albertine R, Magalhães RG, Lopes-Martins RAB, Castro Faria Neto HC, Zangaro RA, Chavantes C, Pacheco MT. Effect of LLLT Ga-Al-As (685nm) on LPS induced inflammation of the airway and lung in the rat. *Lasers Med Sci*. 2005;20(1):11-20.
- Alves WS, Oliveira Júnior GC de, Santo LAE do, Beserra MRS, Carvalho FAZ de. Terapia com laser 670nm no tratamento da DPOC experimental em ratos. *Revista ConScientia e Saúde*. 2010 out-dez;9(4):610-7.
- Tarantino AB. Doenças pulmonares. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
- Rufino R, Silva JRL. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol*. 2006;32(3):241-8.
- Oliveira GC. Efeito da laserterapia de baixa potência na inflamação pulmonar em *rattus norvegicus*. *Revista ConScientia e Saúde*. 2010 ago-nov;9(4):659-66.
- Karu T. Low Power Laser Therapy. *Biomedical Photonics Handbook*. 2003;3:1-25.
- Karu TI. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR irradiation on cells. *J Photochem Photobiol B*. 1999 Mar;49(1):1-17.
- Guerino MR, Baranauskas V, Guerino AC, Parizotto N. Laser treatment of experimentally induced chronic arthritis. *Applied Surface Science*; 2000.
- Jimbo K, Noda K, Suzuki K, Yoda K. Suppressive effects of low-power laser irradiation on bradykinin evoked action potentials in cultured murine dorsal root ganglion cells. *Neurosci Lett*. 1998 Jan 9;240(2):93-6.
- Aimbire FSC, Bjordal JM, Iversen VV, Albertine R, Frigo L, Pacheco MT, et al. Low level laser therapy partially restores trachea muscle relaxation response in rats with Tumor Necrosis Factor- α mediated smooth airway muscle dysfunction. *Lasers in surgery and medicine*. 2006;38(8):773-8.

25. Abreu LM, Batista LV, Pereira GCL, Fonseca LA, Kerppers II, Oliveira CS. Efeito do laser de baixa intensidade no trauma agudo medular- Estudo Piloto. *Revista ConScientia e Saúde*. 2011 set-mar;10(1):11-6.
26. Walker J. Relief from chronic pain by low power laser irradiation. *Neurosci Lett*; 1983 Dec 30;43(2-3):339-44.
27. Carvalho KC. Estudo da resistência cicatricial cutânea de ratos tratados com fototerapia a laser. *Revista ConScientia e Saúde*. 2010 maio-jun;9(2):179-86.
28. Bertolini GRF, Nohama P. Avaliação da conformidade dos equipamentos laser de baixa potência e emissão contínua empregados em Fisioterapia. *Fisioter Mov*. 2007;20(2):13-23.
29. Ciconelli KPC, Del Lama CM, Braga CA, Berro RJ, Lizarelli RFZ, Cedroni ACC. Bioestimulação óssea utilizando laser de baixa densidade de potência diodo semiconductor 830 nm em caso de micro mini implante. *J Bras Odontol Clín*. 1998;2(11):30-42.
30. Cecchini RCM, Cecchini SCM. O papel coadjuvante do Nd: YAG laser na endodontia. Caso clínico. *Rev ABO Nac*.1993;1(2):102-4.

