

# ANÁLISE DO TEMPO DE SOLUBILIZAÇÃO DO MUCO BRÔNQUICO EM PACIENTES PORTADORES DE FIBROSE CÍSTICA COLONIZADOS POR DIFERENTES BACTÉRIAS

**Cristiane Cenachi Coelho<sup>1</sup>, Evanirso da Silva Aquino<sup>2</sup>, Luis Vicente Franco de Oliveira<sup>3</sup>, Paulo Rojo Barja<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>UNIVAP / IP&D / FASBio, Av. Shishima Hifumi 2911, cccoelho@terra.com.br

<sup>2</sup>Uni-bh, Av. Professor Mário Werneck 1685, evanirso-aquino@uol.com.br

<sup>3</sup>UNIVAP / IP&D, Av. Shishima Hifumi 2911, oliveira@univap.br

<sup>4</sup>UNIVAP / IP&D / FASBio, Av. Shishima Hifumi 2911, barja@univap.br

**Resumo** – A fibrose cística (FC) é uma doença genética que resulta em alterações no epitélio respiratório e conseqüentemente na reologia do muco brônquico. Devido à desidratação da secreção nas vias aéreas, ocorre uma diminuição do clearance mucociliar e a colonização do trato respiratório por diversas bactérias, sendo que *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* são os primeiros patógenos geralmente identificados. A técnica fotoacústica tem sido utilizada há mais de 20 anos em diversos campos das ciências biológicas e biomédicas para análise e caracterização das propriedades ópticas e térmicas de vários materiais. O objetivo do presente estudo foi verificar e comparar o tempo de solubilização do muco brônquico em pacientes portadores de FC colonizados por diferentes bactérias através da técnica fotoacústica pela análise da evolução temporal do sinal fotoacústico das amostras. Os resultados indicam que o uso de solução salina isotônica pode ser menos eficiente para a solubilização de muco colonizado por *Pseudomonas aeruginosa*.

**Palavras-chave:** Fotoacústica, fibrose cística, secreção pulmonar.

**Área do Conhecimento:** Ciências da Saúde

## Introdução

A Fibrose Cística (FC) é uma afecção genética caracterizada por uma disfunção generalizada das glândulas exócrinas. Possui caráter evolutivo crônico e progressivo que compromete o funcionamento de praticamente todos os órgãos e sistemas, principalmente o sistema respiratório. Quando não tratada, é responsável pela morte precoce devido à infecção pulmonar (REIS; DAMACENO, 1998; RATJEN; DÖRING, 2003).

As alterações encontradas na doença devem-se a mutações no gene da FC em uma proteína específica e nos canais de cloro, gerando anormalidades no transporte iônico e conseqüentemente a desidratação das secreções pulmonares. Isto dificulta o *clearance* mucociliar e facilita infecções persistentes (WAGENER; HEADLEY, 2003; GILBSON; BURNS; RAMSEY, 2003). Tais infecções são geralmente causadas por bactérias. Entre os microorganismos mais freqüentes nos portadores de Fibrose Cística, destacam-se *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, que depois de instaladas apresentam dificuldade para erradicação. Adicionalmente, a colonização contribui para a destruição progressiva do epitélio pulmonar (PUHELLE; BAJOLET; ABÉLY, 2002).

O efeito fotoacústico foi descoberto em 1880 por Graham Bell (BELL, 1880) e deu origem ao que hoje se conhece como técnica fotoacústica.

Esta técnica se baseia na geração de ondas de pressão numa câmara fechada (célula fotoacústica) devido à absorção de radiação modulada ou pulsada por uma amostra. A radiação absorvida pelo material é transformada em calor; a flutuação de temperatura resultante gera ciclos de expansão e compressão na camada de ar adjacente ao material absorvedor, produzindo ondas de pressão detectadas por um microfone.

O modelamento matemático do sinal é gerado pela solução da equação de difusão térmica para o sistema, tendo como condições de contorno a continuidade do fluxo de calor e a igualdade de temperatura nas interfaces (ROSENCWAIG, 1982; BARJA et al, 2001; LIMA et al, 2005).

A técnica fotoacústica (PA) constitui uma opção experimental para o estudo de propriedades ópticas e térmicas dos mais diversos tipos de materiais, sejam gases, líquidos ou sólidos. Tem sido particularmente utilizada na caracterização de materiais biológicos, dada sua versatilidade e praticidade, já que não requer preparo prévio da amostra (ANJOS, et al, 2005; LAVIANO NETO; BARJA; ACOSTA-AVALOS, 2006).

O objetivo do presente estudo foi verificar e comparar o tempo de solubilização do muco brônquico em pacientes portadores de FC colonizados por diferentes bactérias em solução salina isotônica através da técnica fotoacústica.

## Materiais e Métodos

O estudo foi iniciado após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP e após consentimento por escrito dos pacientes ou responsável.

Foram selecionados pacientes com diagnóstico de FC confirmado pelo teste de suor e que eram capazes de expectorar após a sessão de fisioterapia respiratória. De acordo com a presença ou não de colonização e o tipo de bactéria presente nas amostras, foram divididos em três grupos: **Grupo I:** Pacientes com FC sem colonização; **Grupo II:** Pacientes com FC colonizados por *Staphylococcus aureus*; **Grupo III:** Pacientes com FC colonizados por *Pseudomonas aeruginosa*.

Todas as amostras de muco foram coletadas após a sessão de fisioterapia respiratória. A expectoração foi realizada sobre um coletor universal de escarro previamente tampado com gaze para que o excesso de saliva fosse absorvido (OUT et al.; 2001).

Após o procedimento de coleta, o muco foi armazenado em *ependorf's* preenchidos com óleo de vaselina, para que não ocorresse desidratação do muco. As amostras foram estocadas a uma temperatura de -24°C, com período máximo de duas horas entre a coleta e o congelamento. O material permaneceu congelado por um período máximo de 10 dias (KING, M., 2000).

A montagem experimental empregada utilizou como fonte de luz uma lâmpada halógena de tungstênio (Xelux, 24V - 250W). Para modular a luz desta lâmpada, utilizou-se um modulador mecânico (SRS, mod. SR540 - USA). Lentes e espelhos foram utilizados para levar a luz até a célula fotoacústica, onde um microfone de eletreto detectava o som gerado na câmara. Na célula fotoacústica utilizada, uma das faces foi fechada com uma janela de vidro e a outra (oposta) com uma folha de alumínio de aproximadamente 30µm de espessura.

O modulador mecânico e a saída do microfone foram conectados ao amplificador síncrono (*lock-in* SRS, mod. SR530 - USA), para captação do sinal fotoacústico (amplitude e fase). Por sua vez, o amplificador foi conectado a um computador para registro e processamento dos dados.

As análises experimentais foram realizadas no Laboratório de Fotoacústica Aplicada a Sistemas Biológicos do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da UNIVAP. As amostras utilizadas apresentavam volume de 0,1mL. O descongelamento das amostras era efetuado em dez minutos; imediatamente a seguir, as amostras eram submersas em éter de petróleo, segundo o protocolo descrito por Lorenzi et al. (1992), para que o óleo de vaselina fosse retirado da amostra.

Posteriormente, cada amostra era posicionada num suporte sobre a folha de alumínio, para o início das medidas fotoacústicas.

O sinal fotoacústico foi monitorado através do programa SISCOMF, ajustado para registrar 50 pontos com uma frequência de modulação de 23Hz. As medidas foram realizadas a cada cinco minutos com um tempo total de uma hora e quinze minutos. Nos primeiros 15 minutos, a amostra foi nebulizada com solução salina isotônica através de um nebulizador ultra-sônico, com frequência de 1,6MHz.

A avaliação da solubilização das amostras de muco brônquico foi feita através de monitoramento da amplitude do sinal PA em função do tempo. A evolução temporal do sinal PA foi ajustada pela equação de Boltzmann, dada por:

$$PA(t) = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{t-t_0}{dt}}} + A_2$$

onde PA(t) é a amplitude do sinal PA no tempo t, A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> são respectivamente a amplitude inicial e final do sinal PA, t<sub>0</sub> o tempo de pico da velocidade de solubilização e dt a variação do tempo do processo de solubilização.

Os dados foram armazenados no computador e as curvas de ajuste geradas através do programa Origin 7.5® (Microcal Software Inc.). Utilizou-se o programa Instat para o cálculo da média e erro para cada parâmetro de ajuste.

## Resultados

Foram analisadas vinte e seis amostras de muco. Deste total, sete eram do Grupo I, nove do Grupo II e dez do Grupo III.

Após realizar o ajuste de cada uma das curvas experimentais utilizando a equação de Boltzmann, foram calculados os valores médios (± erro) para cada parâmetro de ajuste: A<sub>1</sub> (u.a.), A<sub>2</sub> (u.a.), t<sub>0</sub> (minutos) e dt (minutos). A Tabela 1 mostra os resultados obtidos.

Tabela 1: Valor médio (± erro) dos parâmetros de ajuste (Boltzmann) das medidas de solubilização do muco brônquico para cada grupo.

|                | Grupo I     | Grupo II    | Grupo III     |
|----------------|-------------|-------------|---------------|
| A <sub>1</sub> | 0,19 ± 0,01 | 0,13 ± 0,01 | 0,192 ± 0,009 |
| A <sub>2</sub> | 0,21 ± 0,01 | 0,14 ± 0,01 | 0,193 ± 0,007 |
| t <sub>0</sub> | 10 ± 2      | 23 ± 4      | 9,4 ± 0,8     |
| Dt             | 4 ± 2       | 2,5 ± 0,9   | 0,2 ± 0,1     |

Em seguida, foi realizada a análise estatística de significância (p≤0,05) para a comparação entre

os valores de  $A_1$  e  $A_2$  dentro de cada grupo; para isso, foi utilizado o teste  $t$  pareado (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação  $A_1$  x  $A_2$  (valores médios  $\pm$  erro) dentro de cada grupo.

|           | $A_1$             | $A_2$             | p     |
|-----------|-------------------|-------------------|-------|
| Grupo I   | $0,19 \pm 0,01$   | $0,21 \pm 0,01$   | 0,107 |
| Grupo II  | $0,13 \pm 0,01$   | $0,14 \pm 0,01$   | 0,111 |
| Grupo III | $0,192 \pm 0,009$ | $0,193 \pm 0,007$ | 0,900 |

Para a comparação entre os três grupos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA, Tabelas 3 e 4). Como  $t_0$  e  $dt$  não apresentaram distribuição normal, para estes parâmetros foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Tabela 4).

Tabela 3: Comparação do valor médio ( $\pm$  erro) dos parâmetros  $A_1$  e  $A_2$  para os três grupos.

| Grupos         | $A_1$                                     | p             | $A_2$                                     | p             |
|----------------|---|---------------|---|---------------|
| I<br>x<br>III  | $0,19 \pm 0,01$<br>x<br>$0,192 \pm 0,009$ | <br>>0,05<br> | $0,21 \pm 0,01$<br>x<br>$0,193 \pm 0,007$ | <br>>0,05<br> |
| I<br>x<br>II   | $0,19 \pm 0,01$<br>x<br>$0,13 \pm 0,01$   | <br><0,05<br> | $0,21 \pm 0,01$<br>x<br>$0,14 \pm 0,01$   | <br><0,01<br> |
| II<br>x<br>III | $0,13 \pm 0,01$<br>x<br>$0,192 \pm 0,009$ | <br><0,01<br> | $0,14 \pm 0,01$<br>x<br>$0,193 \pm 0,007$ | <br><0,05<br> |

Tabela 4: Comparação do valor médio ( $\pm$  erro) dos parâmetros  $t_0$  e  $dt$  para os três grupos.

| Grupos         | $t_0$                            | p             | $dt$                                | p             |
|----------------|----------------------------------|---------------|-------------------------------------|---------------|
| I<br>x<br>III  | $10 \pm 2$<br>x<br>$9,4 \pm 0,8$ | <br>>0,05<br> | $4 \pm 2$<br>x<br>$0,2 \pm 0,1$     | <br>>0,05<br> |
| I<br>x<br>II   | $10 \pm 2$<br>x<br>$23 \pm 4$    | <br><0,05<br> | $4 \pm 2$<br>x<br>$2,5 \pm 0,9$     | <br>>0,05<br> |
| II<br>x<br>III | $23 \pm 4$<br>x<br>$9,4 \pm 0,8$ | <br><0,05<br> | $2,5 \pm 0,9$<br>x<br>$0,2 \pm 0,1$ | <br><0,05<br> |

A Figura 1 exibe as curvas médias de ajuste obtidas pela equação de Boltzmann correspondentes ao processo de solubilização das amostras.

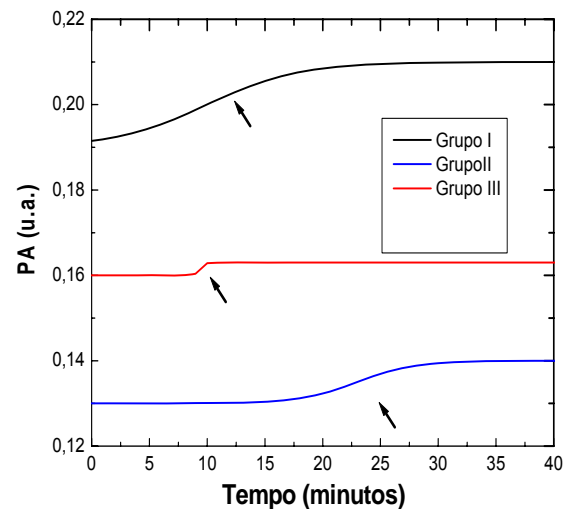


Figura 1: Curvas médias (ajuste Boltzmann) para a solubilização do muco brônquico nos grupos estudados.

### Discussão

Em relação aos resultados em cada um dos grupos estudados não ocorreu diferença significativa entre  $A_1$  e  $A_2$ , apesar de  $A_2$  ter sido maior que  $A_1$  nos três grupos. A tendência de aumento do sinal fotoacústico em função do tempo pode ser explicada pela solubilização do material, que pode alterar as propriedades térmicas da amostra (ROSENCWAIG, 1980; BARJA et al, 2001; LIMA et al, 2005; LAVIANO NETO; BARJA; ACOSTA-AVALOS, 2006).

Ainda em relação a estas variáveis, não foi observada diferença entre o Grupo I x Grupo III, provavelmente, porque o processo de solubilização do muco colonizado por *Pseudomonas aeruginosa* foi iniciado, mas não finalizado, sendo interrompido devido à alta viscosidade do material analisado e da ineficiência da utilização da solução salina isotônica neste caso, como pode ser observado na Figura 1.

Quanto ao parâmetro  $t_0$ , o valor mais alto foi obtido para os pacientes colonizados por *Staphylococcus aureus*, uma vez que o processo de solubilização do muco colonizado por *Pseudomonas aeruginosa* foi incompleto. Quanto ao parâmetro  $dt$ , os pacientes sem colonização apresentaram o maior valor, indicando que o processo de solubilização demandou mais tempo para este grupo. Provavelmente, isto se deve ao fato de que o muco destes pacientes apresentava

alterações menos importantes na viscosidade quando comparado com o grupo de pacientes colonizados por *Staphylococcus aureus*, que também completou o processo de solubilização (REIS; DAMACENO, 1998; SADOWSKA et al, 2002).

## Conclusão

Os resultados do presente estudo estão de acordo com relatos na literatura a respeito da diferença na viscosidade do muco de pacientes portadores de FC colonizados por diferentes patógenos, demonstrando que a técnica fotoacústica pode ser utilizada com sucesso na análise do processo de solubilização do muco brônquico. Os resultados indicam que o uso de solução salina isotônica pode ser menos eficiente para a solubilização de muco colonizado por *Pseudomonas aeruginosa*.

## Referências

- ANJOS, F.H. et al. Sunscreen effect in skin analyzed by photoacoustic spectroscopy. **J. Phys. IV France**. v.125, p. 797-799, 2005.
- BARJA, P.R. et al. Photosynthesis in Eucalyptus studied by the open photoacoustic technique: Effects of irradiance and temperature. **Acoustical Physics** v. 47, p.22-28, 2001.
- BELL, A. G. On the production and reproduction of sound by light, **Am J. Sci.**, 120: 305, 1880.
- GILBSON, R.L; BURNS, J.L; RAMSEY, B.W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 168, p. 918-915, 2003.
- KING, M. Effect of particles on mucus and mucociliary clearance. In: **Lung biology in health and disease – Particle Lung Interactions**. Gehr, P; Heyder, J. New York: Marcel Deker, 2000, p. 521-529.
- LAVIANO NETO, S., BARJA, P.R.; ACOSTA-AVALOS, D. Avaliação fotoacústica de fotopolimerização da resina acrílica z250 (3m) produzida com aparelhos de luz halógena e LED. I EHW, Santos/SP, jul/2006.
- LIMA, L.D. et al. Photoacoustic monitoring of Methylene blue irradiated. **J. Phys IV France**. v. 125, p. 781-783, 2005.
- LORENZI, G. et al. Correlation between rheological properties and in vitro ciliary transport of rat nasal mucus. **Biorheology**. v. 29, p. 433-440, 1992.
- OUT, T. A; JANSEN H. M; LUTTER, R. Methodological aspects in the analysis of spontaneously produced sputum. **Monaldi Arch Chest Dis**. v. 6, p. 493-499, 2001.
- PUCHELLE, E; BAJOLET, O; ABÉLY, M. Airway mucus in cystic fibrosis. **Paediatric Respiratory Reviews**. v. 3, p.115-119.
- RATJEN, F; DÖRING, G. Cystic fibrosis – Seminar. **The Lancet**. v. 361, p. 681-683, 2003.
- REIS, F. J. C; DAMACENO, N. Fibrose Cística. **Jornal de Pediatria**. supl 1, p. s76-s77; s81-s83, 1998.
- ROSENCWAIG, A. **Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy**, New York, 1980.
- ROSENCWAIG, A. Potential clinical applications of photoacoustics. **Clinical Chemistry**. v. 28, p.1878-1881, 1982.
- SADOWSKA, B. et al. Characteristics of *staphylococcus aureus*, isolated from airways of cystic fibrosis patients, and their small colony variants. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 32, p.191-197, 2002.
- WAGENER, J.S.; HEADLEY, A.A. Cystic Fibrosis: Current Trends in Respiratory Care. **Respir Care**. v. 48 (3), p. 234-245, 2003.