Efeito do Laser de Baixa Potência sobre a inflamação das vias aéreas e contratilidade do diafragma de ratos após a exposição ao LPS

Rosana Maria Moreira Santos[1], Hugo C. Faria-Neto[2], Flavio Aimbire Soares de Carvalho[3]

[1] Graduação em Engenharia Biomédica. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade do Vale do Paraíba. Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova, 12244-000- São José dos Campos – SP
e-mail[1]: rosanasantos@vivax.com.br;

[2] Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica da Fundação Oswaldo Cruz - RJ
e-mail[2:] hcastro@iot.fiocruz.br

[3] Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D, Universidade do Vale do Paraíba. Av. Shishima Hifumi 2911 – Urbanova, 12444-000 - São José dos Campos – SP
e-mail[3]: aimbire@univap.br

Resumo: A inflamação das vias aéreas e pulmão induzida por lipopolissacarídeo (LPS) leva ao acúmulo de células inflamatórias resultando na liberação de mediadores inflamatórios que podem contribuir para a redução da força de contração do diafragma. O presente trabalho tem como objetivo investigar o efeito anti-inflamatório da LLLT em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS em ratos. Os animais serão submetidos à administração iv. de LPS de E. colli (5 mg/kg). Decorridos 100, 120 e 140 min da administração de LPS, serão retirados os diafragmas dos animais e submetidos a uma tensão de 2g para avaliação de resposta contrátil. Foram avaliados o perfil celular do Lavado Broncoalveolar (BAL), mensurada os níveis de Prostaglandina (PGE_2) e a atividade da Mieloperoxidase (MPO) no BAL após 100, 120 e 140 min após a instilação intratraqueal de LPS, e aplicação da LLLT 10 J/cm^2. As densidades de energia de 1 e 5 J/cm^2 não foram eficazes. Nossos resultados demonstraram que a LLLT pode reduzir a resposta inflamatória no BAL e a infiltração de neutrófilos no pulmão e melhorar a resposta contrátil de diafragma.

Palavras-chave: LPS, Inflamação Pulmonar, Diafragma, LLLT, Rato
Área do Conhecimento: III - Engenharias

1 Introdução

A inflamação das vias aéreas e pulmão induzida por lipopolissacarídeo (LPS) é caracterizada pelo aumento da resposta contrátil da musculatura lisa frente a estímulos não específicos [1]. A exposição ao LPS freqüentemente leva ao acúmulo de linfócitos, mastócitos e macrófagos, resultando em inflamação e na liberação de mediadores inflamatórios que podem contribuir para as alterações de estrutura e função das vias aéreas e pulmão [2]. Krause e col. [3] reportam em modelo experimental de endotoxemia, que o acúmulo de células inflamatórias adjacentes ao músculo diafragma, podem contribuir para a redução da força de contração e do período de fadiga.

A literatura reporta poucos estudos demonstrando o efeito da terapia com laser de baixa potência (LLLT) sobre a inflamação das vias aéreas e pulmão. Milojevic & Kuruc [4] estudaram o efeito da LLLT no tratamento de pacientes com asma brônquica e observaram que a LLLT aumentou a complacência pulmonar e a ventilação, os quais são parâmetros funcionais importantes na asma brônquica.

2.- Objetivo

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo investigar o efeito anti-inflamatório da LLLT em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS em ratos.

3. Material e Métodos

3 .1-Animais

Serão utilizados ratos machos (160-200 g) provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica da Fundação Oswaldo Cruz (RJ).

3 .2 Administração do LPS

Os animais serão submetidos a administração intravenosa de LPS de Escherichia colli (5 mg/kg). Decorridos 100, 120 e 140 minutos da administração de LPS, os animais serão sacrificados com dose excessiva de anestésico inalatório (halotano) e os segmentos de diafragma serão retirados para estudos de contração.

3.3 - Preparação dos segmentos de diafragma de rato

Após o sacrifício, o diafragma será então montado para registro das contrações. Para tanto, será usado um sistema multicanal de tecido isolado (MacLab) acoplado a um sistema de aquisição, análise e estocagem de dados (MacLab). Os segmentos diafragma tecidos serão montados em cubas para órgão isolado (25 ml), contendo uma solução de Krebs-Henseleit.

3.4 - Construção da curva concentração-resposta

Os segmentos de diafragma serão submetidos a uma tensão de 2 g. Decorridos 30 minutos de equilíbrio serão construídas curvas concentração-resposta através de estímulos elétricos.

3.5 - Lavado Broncoalveolar (BAL)

O influxo de células inflamatórias foi avaliado 100, 120 e 140 minutos após a instilação intratraquel de LPS, como previamente descrito pelo método de [5].

3.6 – Determinação de prosatglandina (PGE_2) no BAL

A concentração de prostaglandina (PGE_2) no BAL foi mensurada através da técnica de radioimunoensaio [10], 100, 120 e 140 minutos após a instilação intratraqueal de LPS.

3.7 – Atividade da Mieloperoxidase no BAL

A atividade da mieloperoxidase foi usada como indicador da presença de neutrófilos no pulmão 100, 120 e 140 minutos após a instilação intratraqueal de LPS. O tratamento com a LLLT com As-GA-Al foi idêntica ao protocolo usado no BAL. O ensaio no qual foi baseado no método descrito por Goldblum et al. [6].

3.8 - Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) 5%, seguido de teste Tukey (5%). Os dados são expressos como média ± EPM.

4.- Resultados

4.1 - Efeito da LLLT (As-Ga-Al) sobre o BAL de ratos tratados com LPS

A Figura 1 mostra o perfil celular do BAL de ratos tratados com As-Ga-Al que receberam ou não LPS.

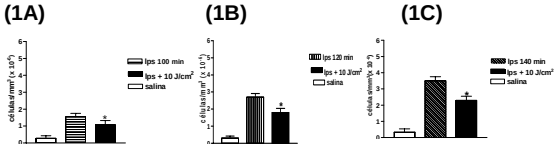

Figura 1 (1A, 1B e 1C) Perfil celular do BAL de ratos tratados com As-Ga-Al que receberam ou não LPS.

As Figs. 1A, 1B e 1C mostram o efeito da LLLT sobre a composição celular do BAL 100, 120 e 140 min respectivamente após a instilação intratraqueal de LPS. A LLLT com 10 J/cm^2 foi capaz de reduzir o numero de células inflamatórias no BAL de ratos tratados com LPS em todo os períodos estudados.

4.2 - Efeito da LLLT (As-Ga-Al) sobre a infiltração de neutrófilos no pulmão de ratos tratados com LPS.

A infiltração de neutrófilos no pulmão foi mensurada a partir dos níveis de mieloperoxidase.

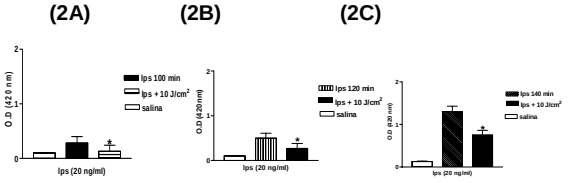

Figura2 (2A, 2B, 2C) Efeito da LLLT sobre o influxo de neutrófilos no pulmão

As Figs. 2A, 2B e 2C mostram o efeito da LLLT sobre o influxo de neutrófilos no pulmão

de ratos 100, 120 e 140 min após a instilação intratraqueal de LPS. A densidade de energia de 10 J/cm^2 reduziu os níveis de atividade da mieloproxidase em homogenado de pulmão 100, 120 e 140 min após a instilação intratraqueal de LPS (37.7 %, 52.3 e 77.5 de inibição) respectivamente.

4.3 Efeito da LLLT (As-Ga-Al) sobre os níveis de PGE_2 no BAL de ratos tratados com LPS

A Figura 3 mostra o os níveis de PGE_2 no BAL de ratos tratados com As-Ga-Al que receberam ou não LPS.

(3A) (3B) (3C)

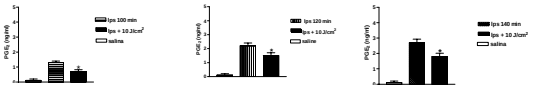

Figura 3 (3A, 3B, 3C) Efeito da LLLT (As-Ga-Al) sobre os níveis de PGE_2 no BAL de ratos tratados com LPS

As Figs. 3A, 3B e 3C mostram o efeito da LLLT sobre os níveis de PGE_2 no BAL de ratos tratados com LPS. A LLLT com 10 J/cm^2 reduziu os níveis de PGE_2 100, 120 e 140 min após a instilação intratraqueal de LPS quando comparado com os seus respectivos grupos controle.

4.4 – Efeito da LLLT sobre a resposta contrátil de diafragma de ratos tratados com LPS

A Fig.4 mostra o perfil temporal da resposta contrátil do diafragma de ratos irradiados com As-Ga-Al que receberam ou não injeção intravenosa de LPS. Após a administração de LPS, a força de contração de segmentos de diafragma foi reduzida durante todo o perfil temporal quando comparado como seus respectivos controles. A densidade de energia de 10 J/cm^2 foi eficaz em restaurar o padrão de resposta contrátil do diafragma.

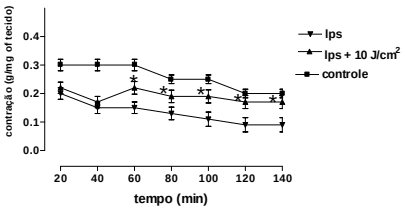

Fig. 4 Efeito da LLLT sobre a resposta contrátil de diafragma de ratos tratados com LPS

5. Discussão

Diversos estudos têm mostrado que a terapia com laser de baixa potência (LLLT) é capaz de reduzir o a resposta inflamatória em diferentes modelos experimentais. Entretanto, o mecanismo de ação da LLLT como anti-inflamatório ainda não está totalmente elucidado. Isto deve-se a grande dificuldade em estabelecer qual a dosimetria correta, ou seja, determinar o comprimento de onda apropriado, número de aplicações, tempo de irradiação e densidade de energia adequados para cada tipo de processo inflamatório. Neste sentido, o presente estudo investigou o efeito anti-inflamatório da LLLT com As-Ga-Al sobre o BAL, a atividade da MPO e a resposta contrátil do diafragma em modelo de inflamação pulmonar induzida pelo LPS de *Escherichia coli*.

Estudos clínicos têm revelado os efeitos benéficos da LLLT em diversas patologias inflamatórias, inclusive Síndromes como a asma. De fato, Milojevic & Kuruc [7] mostraram que a LLLT pode melhorar os parâmetros da função pulmonar em asma brônquica humana e que o efeito anti-inflamatório da LLLT está relacionado à síntese de foto-produtos, que diretamente ou indiretamente ativam vias metabólicas distintas que participam do processo inflamatório. Karu [8] corrobora com esta observação.

Mediadores inflamatórios podem ser gerados por células residentes das vias aéreas e pulmão, como pelas células que migram da circulação sangüínea para as vias aéreas durante o processo inflamatório. A redução de mediadores pro-inlfamatórios pode amenizar a resposta contrátil do diafragma e o remodelamento das paredes das vias aéreas [9]. Adicionalmente, esses mediadores podem facilitar o recrutamento e ativação de outras células inflamatórias, potencializando assim a inflamação. Nossos resultados mostram que a LLLT com densidade de energia de 10 J/cm^2 reduziu o número de células inflamatórias no BAL de animais que receberam o LPS quando comparado como o grupo controle (animais não irradiados que receberam LPS). O mesmo ocorreu quando analisamos o efeito

da LLLT sobre a concentração de prostaglandina (PGE_2) no BAL de animais que receberam LPS. De fato a LLLT reduziu os níveis de PGE_2 no BAL de animais expostos ao LPS.

A infiltração de neutrófilos no pulmão foi quantificada indiretamente através da atividade da MPO. O tratamento com As-Ga-Al com densidade de energia de 10 J/cm^2 reduziu a atividade da MPO em todos os tempos estudados após a instilação intratraqueal de LPS quando comparado com o grupo controle.

Em outra série de experimentos, investigamos o efeito da LLLT sobre a resposta contrátil de segmentos de diafragma de ratos após o LPS. Nossos resultados mostram que o LPS alterou o padrão de resposta contrátil do diafragma em todos os períodos de tempo. De fato, após exposição ao LPS, os animais sofreram uma significativa redução da capacidade de contração do diafragma. Por outro lado, a irradiação com As-Ga-Al com 10 J/cm^2 reverteu, ainda que parcialmente, esta resposta, aumentando o padrão de contração do diafragma de ratos

6. Conclusão

Por fim, nossos resultados demonstraram que a resposta inflamatória no BAL e a infiltração de neutrófilos no pulmão podem ser reduzidas pelo efeito fotoquímico da LLLT, que parece ser devido a inibição dos efeitos de produtos da COX –2. Além disso, a LLLT também interfere na resposta contrátil de diafragma, e a partir deste resultado, é razoável sugerir que a LLLT também pode contribuir de forma significativa para a melhora de parâmetros relacionados à função pulmonar.

6 - Referências Bibliográficas

[1] LOUIE S, Halliwell B, Cross EC. (1997) Adult Respiratory Distress Syndrome: A Radical Perspective. Adv. Pharmacol., 38: 457-490.

[2] MCKAY S, Sharma HS (2002) Autocrine regulation of asthmatic airway inflammation: role of airway smooth muscle. Respir Res. 2002;3(1):11.

[3] KRAUSE KM, Moody MR, Andrade FH, Taylor AA, Miller CC III, Kobzik L, Reid MB**.** Peritonitis Causes Diaphragm Weakness in Rats. Am J Respir Crit Care Med Vol 157. pp 1277–1282, 1998.

[4] MILOJEVIC M, Kuruc V (2003) Laser biostimulation in the treatment of pleurisy Med Pregl. 56(11-12):516-20.

[5] SELIG W, Tocker J (1992) Effect of interleukin-1 receptor antagonist on antigen-induced pulmonary responses in guinea pigs. Eur J Pharmacol. 31;213(3):331-6.

[6] GOLDBLUM SE, Wu KM, Jay M (1985) Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits.J Appl Physiol. Dec;59(6):1978-85.

[7] BRADDING P, Redington AE, Holgate ST (1997).Airway wall remodeling in the pathogenesis of asthma: cytokine expression in the airway . In Airway Wall Remodelling in asthma (ed) Stewart AG. London: CR; 29-63.

[8] KARU TI,(2000) Mechanisms of low-power laser light action on cellular level. In: Z. Simunovic (ed) Laser in medicine and dentistry. Vigraf, Rijeka, pp97-125.

[9] VIGNOLA AM, Chanez P, Bonsignore G, Godard P, Bousquet J (2000) Structural consequences of airway inflammation in asthma J Allergy Clin Immunol.105 (2 pPt): S514.

[10] FITZPATRICK TM, Alter I, Corey EJ, Ramwell PW, Rose JC, Kot PA (1978) Antagonism of the pulmonary vasoconstrictor response to prostaglandin F2alpha by N-dimethylamino substitution of prostaglandin F2alpha J Pharmacol Exp Ther. Jul; 206(1):139-42.