

# EFEITOS DO LASER ISOLADO E ASSOCIADO À NATAÇÃO NA INFLAMAÇÃO PULMONAR EM *Rattus norvegicus*

## EFFECTS OF ISOLATED AND ASSOCIATED SWIMMING LASER ON PULMONARY INFLAMMATION in *Rattus norvegicus*

DAVID HALEN ARAÚJO PINHEIRO<sup>1</sup>, KARINA VASCONCELOS DA SILVA<sup>2</sup>, DAVI MACHADO DE CARVALHO ARAÚJO<sup>3</sup>, KELLYANNE SOARES DE SOUSA<sup>4</sup>, ESMERALDA MARIA LUSTOSA BARROS<sup>5</sup>, KARINNE SOUSA DE ARAÚJO<sup>6</sup>, ANA FLÁVIA MACHADO DE CARVALHO<sup>7\*</sup>

1. Mestrando em Engenharia Biomédica – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba; 2. Pós-graduanda em Osteopatia Estrutural; 3. Acadêmico do Curso de Medicina do Centro Universitário UniFacid; 4. Especialista pelo Programa de Residência Multiprofissional em Saúde - Universidade Federal do Piauí; 5. Mestre em Ciências e Saúde e Técnica do Laboratório de Fisiologia - Universidade Federal do Piauí; 6. Doutora em Biotecnologia - Universidade Federal do Piauí e Docente do Centro Universitário UniFacid; 7. Doutora em Engenharia Biomédica - Universidade do Vale do Paraíba e Docente do Centro Universitário UniFacid.

\* R. Veterinário Bugyja Brito, 1354 - Horto, Teresina - PI, 64052-410. Centro Universitário UniFacid. [anafaviaparaibana@hotmail.com](mailto:anafaviaparaibana@hotmail.com)

Recebido em 01/07/2020. Aceito para publicação em 10/08/2020

### RESUMO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) caracteriza-se pela limitação crônica e persistente do fluxo de ar. Geralmente é progressiva e resulta em uma resposta inflamatória anômala das vias aéreas e do parênquima pulmonar. É uma doença ocasionada pela exposição à fumaça do cigarro, à exposição ocupacional e à combustão de biomassa, isso devido a uma dilatação dos espaços aéreos distais nos bronquíolos terminais. O processo inflamatório crônico à exposição do cigarro pode promover alterações como bronquite crônica, bronquiolite respiratória, e ainda causar destruição do parênquima pulmonar, resultando no enfisema pulmonar. A melhora do estado geral em saúde tem sido uma preocupação constante em o todo mundo, para isso, diversas terapias alternativas têm sido inseridas, dentre elas destaca-se o laser e a natação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Inflamação pulmonar; DPOC; Laserterapia; Natação.

### ABSTRACT

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is characterized by chronic and persistent airflow limitation. It is usually progressive and results in an abnormal inflammatory response of the airways and lung parenchyma. It is a disease caused by exposure to cigarette smoke, occupational exposure and combustion of biomass, this is due to a dilation of the distal air spaces in the terminal bronchioles. The chronic inflammatory process to cigarette exposure can promote changes such as chronic bronchitis, respiratory bronchiolitis, and even cause destruction of the lung

parenchyma, resulting in pulmonary emphysema. The improvement of the general health status has been a constant concern worldwide, for this reason, several alternative therapies have been inserted, among which the laser and swimming stand out.

**KEYWORDS:** Pulmonary inflammation; COPD; Laser Therapy; Swimming.

### 1. INTRODUÇÃO

A Iniciativa Global para a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, publicado em 2018, definiu a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) como uma limitação crônica e persistente do fluxo de ar, geralmente progressiva e que resulta em uma resposta inflamatória anômala das vias aéreas e do parênquima pulmonar. Esse mal é ocasionado pela exposição à fumaça do cigarro, exposição ocupacional e combustão de biomassa, os quais provocam uma dilatação dos espaços aéreos distais nos bronquíolos terminais<sup>1</sup>.

A DPOC pode ser classificada em enfisema pulmonar, que é o aumento anormal dos espaços aéreos distais em relação ao brônquio terminal, e em bronquite crônica, que é uma condição caracterizada pela secreção excessiva de muco na árvore brônquica<sup>2</sup>. A DPOC, atualmente, é um problema de saúde de grande relevância, não apenas pela sua alta prevalência, mas devido às comorbidades relacionadas à este quadro, o que eleva as taxas de mortalidade<sup>3,4</sup>.

A DPOC gera alterações extrapulmonares significativas para o organismo, tais como a desnutrição, inflamação sistêmica, perda da massa muscular, depressão, descondicionamento físico, disfunção diafragmática e musculatura periférica. Desta

forma, gera um impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes<sup>5,6</sup>.

O tabagismo é considerado a causa mais comum de morte evitável no mundo, pois aumenta o risco de óbito por doenças como câncer, doença isquêmica do coração, DPOC, entre outras<sup>7</sup>.

A exposição crônica à fumaça de cigarro prejudica o transporte mucociliar, provoca alterações metaplásicas da mucosa respiratória, com aumento no número e tamanho de células caliciformes e consequente aumento de secreção nas vias aéreas<sup>8</sup>.

A melhora do estado geral em saúde tem sido uma preocupação constante em todo mundo. Diversas terapias alternativas têm sido inseridas, dentre elas destaca-se a Terapia a Laser de Baixa Intensidade (TLBI) e a Natação.

A TLBI vem sendo utilizada clinicamente desde 1981 no tratamento de pacientes com patologias inflamatórias. É uma abordagem relativamente nova e promissora, com baixo custo, não invasiva e com vários feitos biomoduladores para o organismo<sup>9</sup>.

A natação tem se mostrado muito eficaz como recurso terapêutico no tratamento de pacientes com acometimentos respiratórios<sup>10</sup>.

Sendo assim, o estudo em questão proporciona para a sociedade e a comunidade científica novos dados a respeito das alterações do cigarro sobre o sistema respiratório, e com terapias alternativas, promovendo ação anti-inflamatória, tanto da TLBI como da natação. Diante desse aspecto, esse estudo objetiva analisar os efeitos anti-inflamatórios da TLBI (904nm) isolado e associado à natação em *Rattus norvegicus* por meio da inflamação pulmonar induzida pela fumaça de cigarro em modelo experimental.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Universo dos Animais e Distribuição dos Grupos Experimentais

Trata-se de um estudo do tipo experimental, descritivo, comparativo e quantitativo. Foram utilizados 24 *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, machos, com 12-15 semanas, pesando 300-350 gramas, adquiridos no biotério de uma instituição de ensino superior. Os animais foram mantidos em ambiente higienizado, em temperatura ambiente entre 20 a 24°C, sendo acondicionados em gaiolas forradas com palha e mantidos em um ciclo de 12 horas claro/escuro com livre acesso à água e ração.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos, compostos por 6 animais cada um. A divisão ocorreu da seguinte forma:

Grupo Controle (GC): animais expostos apenas às condições de ar ambiente.

Grupo Exposto à Fumaça do Cigarro (GEFC): animais expostos à fumaça de cigarro por inalação passiva sem tratamento.

Grupo Exposto à Fumaça do Cigarro + Terapia a Laser de Baixa Intensidade (GEFC+TLBI): animais expostos à fumaça de cigarro por inalação passiva e

após o período estabelecido tratados com a TLBI.

Grupo Exposto à Fumaça do Cigarro e tratado com a Terapia a Laser de Baixa Intensidade e associado com a Natação (GEFC+TLBI+N): os animais foram expostos à fumaça do cigarro por inalação passiva, tratados com a TLBI após o estabelecimento da inflamação pulmonar, e em seguida, aplicado o protocolo de natação.

### Indução da Inflamação Pulmonar

A indução da inflamação se deu através da inalação da fumaça do cigarro comercial (alcatrão 5 mg, nicotina 0,5mg e monóxido de carbono 5mg), em que os animais dos grupos expostos foram fumantes passivos, inalando a fumaça de 10 cigarros por dia, durante 5 dias na semana. Assim, cada protocolo teve duração de 20 minutos durante 30 dias. Durante todo o experimento foi utilizada a mesma marca e lote do cigarro. Os animais foram expostos à fumaça em uma caixa de madeira cujas medidas foram 100x44x44 cm, com circulação de ar.

### Aplicação da Terapia a Laser de Baixa Intensidade

Após 30 dias de exposição à fumaça do cigarro, os animais do GEFC+TLBI e do GEFC+TLBI+N, foram submetidos à aplicação do *Laser Physiolum Dual*, diodo arseneto de gálio (AsGa), com comprimento de onda de 904 nm, potência de 25 W, dosagem de 3 J/cm<sup>2</sup> com duração de um minuto e nove segundos para cada ponto. A forma de aplicação foi de contato pontual, formando um ângulo de 90°, em três segmentos na face frontal do tórax, sendo um ponto na região da carina e outros dois no centro de cada hemitórax. Antes do protocolo da TLBI foi realizada a tricotomia na região torácica dos animais. A caneta do laser foi protegida por um papel filme transparente.

### Protocolo de Natação

Três animais, por vez, do grupo GEFC+TLBI+N foram submetidos ao exercício físico, em uma bacia com capacidade de 80L e contendo água na temperatura de 30 ± 1°C. O protocolo de tratamento teve início no primeiro dia após a aplicação do laser, prolongando-se por 5 dias na semana com duração de 13 minutos por dia, no total de 10 dias.

### Análise do Lavado Broncoalveolar (LBA)

Para a quantificação dos neutrófilos, realizou-se o LBA. Foram selecionados três animais de cada grupo, que foram anestesiados por dose de ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg). Em seguida, foi realizada uma incisão longitudinal na região cervicoventral para exposição e canulação da traqueia com o tubo flexível de um escalpe. Foram ejetados 20 mL de soro fisiológico nos pulmões e aplicadas massagens circulares em ambos hemitórax para lavar o espaço bronco alveolar, sendo posteriormente, aspirados 10 mL de secreção pulmonar.

### Eutanásia e Análise Histológica

Todos os animais foram sacrificados com hiperdosagem de anestésico tiopental sódico 300mg/Kg para a realização da análise histológica. A referida análise pulmonar foi realizada no modelo de inflamação sistêmica. Para tanto, o lobo pulmonar inferior esquerdo foi separado e submetido ao processo de fixação, permanecendo em formol a 10% por 48 horas para, então, serem realizados os cortes de parênquima pulmonar com espessura de 5µm e corados com hematoxilina-eosina (HE). Após o preparo e obtenção das lâminas, foi realizado o registro fotográfico digital da imagem microscópica de cada amostra e a contagem das células inflamatórias, utilizando-se um aumento padrão de 400x, que foi transferida para o *Software Image J, versão 1,47*.

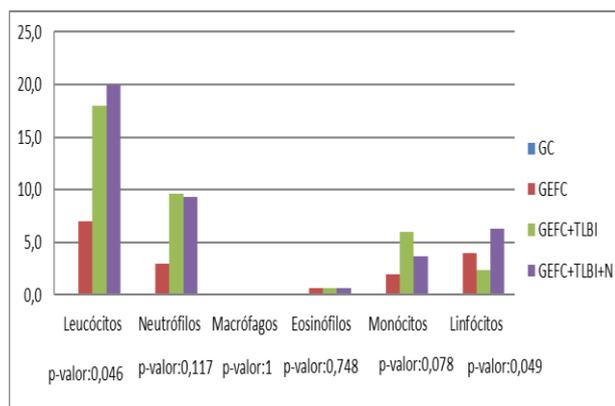
### Análise Estatística e Procedimentos Éticos

Os dados foram tabulados em planilha eletrônica Microsoft Office Excel 2016 e analisados no programa IBM *Statistical Package for the Social Sciences* versão 20.0. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, em seguida, ao teste Kruskal Wallis, e para o pós-teste, aplicou-se o Mann-Whitney, com a adoção de nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

O presente estudo foi iniciado após a submissão e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA do Centro Universitário UniFacid, em conformidade ao Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, conforme a Lei Federal nº 11.794 sob o protocolo de número 07/2017.

### 3. RESULTADOS

De acordo com os achados apresentados no gráfico 01, por meio das células inflamatórias presentes LBA, verifica-se que houve diferença significativa entre os grupos do estudo, destacando-se os leucócitos e linfócitos, com  $p=0,046$  e  $p=0,049$ , respectivamente.



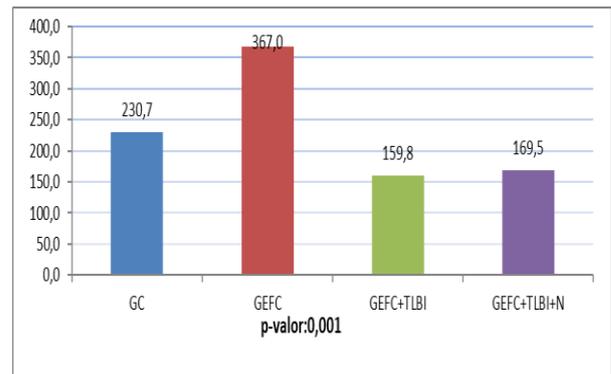
**Figura 1.** Comparação das células inflamatórias presentes no lavado broncoalveolar nos grupos: GC, GEFC, GEFC+TLBI e GEFC+TLBI+N. Teste Kruskal Wallis.

O gráfico acima mostra a contagem de neutrófilos do LBA em ratos dos quatro grupos participantes da pesquisa, mostrando proporções mais elevadas destas células nos grupos GEFC+TLBI e no GEFC+TLBI+N em comparação ao grupo GC e ao GEFC, não havendo

diferença significativa ( $p=0,117$ ).

Analisando os linfócitos na tabela 01, houve um declínio significativo no grupo GEFC+TLBI em comparação ao grupo GEFC ( $p=0,049$ ), porém, quando se associou à natação, houve um aumento significativo destas células.

Dados da contagem total de células inflamatórias encontradas nas fotomicrografias do lobo pulmonar (Gráfico 02), mostram que houve uma diminuição significativa de células inflamatórias quando se comparam os grupos GEFC+TLBI e os GEFC+TLBI+N ( $p=0,001$ ) em relação ao GEFC.



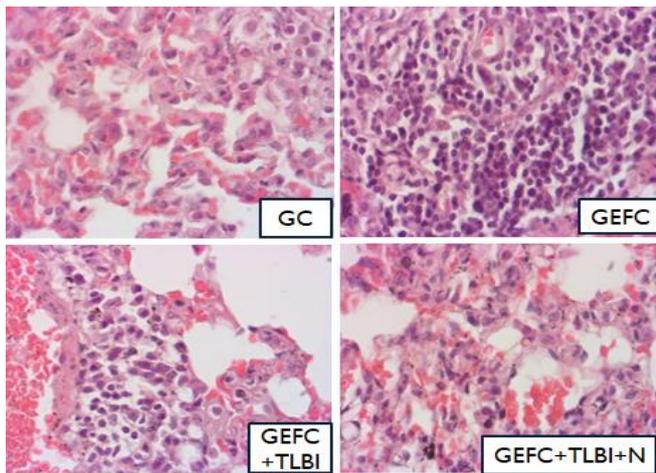
**Figura 2.** Comparação das células inflamatórias encontradas nas fotomicrografias do lobo pulmonar nos grupos: GC, GEFC, GEFC+TLBI e GEFC+TLBI+N. Teste Kruskal Wallis.

Comparando os protocolos de tratamento dos grupos estudados por meio das células totais pelas fotomicrografias, este estudo obteve resultado significativo com variância de  $p=0,004$  entre os grupos, porém, o laser isolado apresentou redução significativa destas células, ao se comparar com o grupo exposto, mas quando ele foi associado à natação, não promoveu redução significativa dessas células inflamatórias, segundo a tabela 01.

**Tabela 1.** Comparação entre os grupos de tratamentos do GEFC+TLBI e GEFC+TLBI+N. Pós-teste Mann-Whitney.

Grupos - Fotomicrografias	GC	GEFC	GEFC+TLBI	GEFC+TLBI+N
GC	1,000			
GEFC	<b>0,037</b>	1,000		
GEFC+TLBI	<b>0,013</b>	<b>0,004</b>	1,000	
GEFC+TLBI+N	<b>0,010</b>	<b>0,004</b>	0,631	1,000

A Figura 03 apresenta os aspectos qualitativos do processo inflamatório em ratos pela fumaça do cigarro, tratados com a TLBI isolado e associado à natação. É possível observar que no grupo GEFC+TLBI e GEFC+TLBI+N houve uma redução do processo inflamatório, devido uma maior diminuição das células inflamatórias, quando comparado com o grupo GC e ao GEFC.



**Figura 3.** Fotomicrografias de células totais em cortes representativos das alterações. GC: sem alterações significativas. GEFC: observa-se uma extensa área de infiltrado inflamatório. Em comparação área de infiltrado inflamatório, observa-se uma menor quantidade no grupo GEFC+TLBI em relação ao grupo GEFC+TLBI+N.

#### 4. DISCUSSÃO

O LBA é o procedimento mais confiável para quantificar a abundância de neutrófilos, pois estas células migram diretamente dos capilares para o espaço alveolar<sup>11</sup>. Estudos com animais, em especial ratos ou camundongos, demonstram que a exposição à fumaça de cigarros, de forma passiva, por menor tempo possível, já é capaz de estimular células inflamatórias que podem ocasionar inflamações pulmonares associadas ao enfisema<sup>12</sup>.

Conforme estudo de Fonseca *et al*<sup>4</sup>, com 24 ratos divididos em três grupos de 8 animais, dois destes grupos induzidos a DPOC, por meio da dose única de instilação de papaína 0,2 mg/kg, e o terceiro grupo tratado com laser 660 nm, com potência de 10 W, na dose de 12,5 J/cm<sup>2</sup> por 20 segundos/ponto por 15 dias, foi possível verificar diminuição no número de células inflamatórias no LBA do grupo tratado com laserterapia, quando comparado com os outros grupos do estudo.

O resultado encontrado na redução dos linfócitos no grupo GEFC+TLBI, vai de acordo com o descrito por Pessoa *et al*<sup>13</sup>, em que a TLBI foi aplicada em ratos, divididos em três grupos, sendo: grupo controle, grupo DPOC e o grupo DPOC + Laser. Ainda, no estudo citado, houve uma diminuição significativa ( $p=0,05$ ) dos linfócitos comparados com o grupo da DPOC. As respostas inflamatórias levam o aumento das células envolvidas durante este processo, a fim de gerar homeostasia para o organismo, dentre elas, estão: macrófagos, neutrófilos e linfócitos<sup>14</sup>.

O resultado encontrado neste estudo, é semelhante ao relatado na literatura, em que os autores obtiveram uma redução significativa das células inflamatórias encontradas nas fotomicrografias do parênquima pulmonar quando se comparam os grupos lesão e tratado ( $p=0,05$ ) com o controle<sup>4</sup>.

Observa-se que o grupo GEFC+TLBI apresentou significativa redução de células inflamatórias em

relação ao grupo GEFC+TLBI+N e mesmo comportamento em relação ao número de células inflamatórias comparado ao GC e ao GEFC. Considerando número de células inflamatórias, esse resultado associa-se com o estudo de Pieta<sup>15</sup>, em que houve uma redução das células inflamatórias ao aplicar a TLBI. Moraes *et al.*<sup>9</sup> também encontraram a redução do infiltrado inflamatório por meio da TLBI em comparação com o grupo não tratado.

#### 5. CONCLUSÃO

A TLBI isolada é eficaz na atenuação do infiltrado inflamatório, e quando associado à natação, não houve diferença significativa. Além disso, o recurso não substitui o tratamento medicamentoso, entretanto, poderá ser aplicada como um novo mecanismo na intervenção da DPOC.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Ao Centro Universitário UniFacid pelo o apoio durante a realização do estudo.

#### 7. REFERÊNCIAS

- [1] Global Initiative For Chronic Obstructive Lung Disease: Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. GOLD.2018. [acesso 30 jun. 2020] Disponível em: [https://goldcopd.org/wpcontent/uploads/2017/11/GOLD-2018-v6.0-FINAL-revised-20-Nov\\_WMS.pdf](https://goldcopd.org/wpcontent/uploads/2017/11/GOLD-2018-v6.0-FINAL-revised-20-Nov_WMS.pdf)
- [2] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Doenças respiratórias crônicas. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica– (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica, n. 25) – Brasília: Ministério da Saúde. 2010.
- [3] Fonseca KM, Melo Rodrigues L, Ferreira DCL, Vilaça MMO, Galvão SMP, Santos AW. Efeitos da fotobiomodulação nas alterações extrapulmonares ocasionadas pelo enfisema experimental em *rattus norvegicus*. *Saúde e Pesquisa* 2016; 9(1):143-152.
- [4] Fonseca KM, Pessoa DR, Alves, WS. Efeitos da laserterapia nas alterações extrapulmonares ocasionadas pelo enfisema experimental em *rattus norvegicus*. XX Encontro latino americano de iniciação científica, XVI Encontro latino americano de pós-graduação e VI Encontro de iniciação à docência. 27 e 28 de outubro de 2016; São José dos Campos-SP, Brasil, INIC. 2016.
- [5] Kuhl, CP. Desenvolvimento de diferentes graus de enfisema pulmonar induzido por elastase em camundongos. 2013. 84f. Dissertação [Mestre em Ciências Cirúrgicas] – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2013.
- [6] Rocha FR, Brüggemann AKV, Francisco DDS, Medeiros CSD, Rosal D, Paulin E. Relação da mobilidade diafragmática com função pulmonar, força muscular respiratória, dispnéia e atividade física de vida diária em pacientes com DPOC. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2017; 43(1):32-37.
- [7] Hallal AL, Macario AMM, Souza RH, Boing AF, Botelho L, Cohen J. Associação entre a exposição a

- maços de cigarros em pontos de venda e susceptibilidade ao tabagismo entre adolescentes brasileiros. *J Bras Pneumol.* 2018; 44(1):49-51. <http://dx.doi.org/10.1590/S180637562016000000331>.
- [8] Tamashiro E, Cohen NA, Palmer JN, Lima WTA. Efeitos do cigarro sobre o epitélio respiratório e sua participação na rinosinusite crônica. *Braz. J. of Otorhinol.* 2009; 75(6):903-907. <https://doi.org/10.1590/S180886942009000600022>.
- [9] Cunha MG, Vitoretti LB, Brito AA, Alves CE, Oliveira NCR, Santos DA, Candeo LC. Low-level laser therapy reduces lung inflammation in an experimental model of chronic obstructive pulmonary disease involving P2X7 receptor. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6798238>.
- [10] Soares PG; Fátima JJ. A natação enquanto forma de fisioterapia respiratória. *Instrumento: Revista de Estudo e Pesquisa em Educação.* 2010; 12(1).
- [11] Alves WS, Oliveira Júnior GC, Santo LAE, Beserra RS, Carvalho FAZ. Terapia com laser 670nm no tratamento da DPOC experimental em ratos. *ConScientiae Saúde.* 2010; 9(4):610-617.
- [12] ALVES, W.S. Estudo do efeito da terapia com laser de baixa potência sobre a inflamação pulmonar induzida pela doença pulmonar obstrutiva crônica experimental (DPOC) em ratos. 2010. 71 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Biomédica) – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, São Paulo. 2010.
- [13] Pessoa, D. R., Fonseca, K. M., de Sousa Reis, E. V., Junior, J. L. P., & dos Santos Alves, W. Laserterapia na inflamação pulmonar experimental em *rattus norvegicus* ocasionado pela papaína. *Revista Univap.* 2017; 22(40):262.
- [14] Rufino, R., & da Costa, C. H. (). Patogenia da doença pulmonar obstrutiva crônica. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto.* 2013; 12(2).
- [15] Pieta J. Laser de baixa potência na fase aguda da inflamação na síndrome do desconforto respiratório agudo. Trabalho de Conclusão de Curso (Fisioterapeuta) – Faculdade Integral Diferencial, Teresina, Piauí. 2012. 69 f.