

# INFLUÊNCIA DA FISIOTERAPIA RESPIRATÓRIA NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Camila Gabriele M. Alencar<sup>1</sup>; Almiरेne C. Amirato<sup>2</sup>; Erbênia Maria M. Araújo<sup>2</sup>; Laura Viana Chaves<sup>3</sup>; Daniel Salgado Xavier<sup>4</sup>

## RESUMO

**Introdução:** A Leucemia Linfóide Aguda - LLA é uma neoplasia hematológica que envolve a proliferação, acumulação e infiltração de células imaturas na medula óssea. Além disso, a doença deprime o sistema respiratório e o paciente permanece acamado enquanto se submete ao tratamento com medicações com alto teor químico, o propósito desse estudo é usar a Fisioterapia Respiratória, a qual usa estratégias e meios de prevenção e tratamento, avaliando a sua influência em relação ao perfil imunológico do paciente leucêmico. **Objetivos:** O estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da Fisioterapia Respiratória em pacientes com LLA, quantificando as concentrações de citocinas TH1, TH2 e inflamatórias pré e pós a aplicação de cinesioterapia respiratória. **Métodos:** foram selecionados pacientes de 08 a 50 anos, recém-diagnosticados, os quais foram convidados a participar do projeto e ao consentir, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, estes foram divididos em dois grupos: o grupo A (n=14) - pacientes tratados com fisioterapia respiratória) e o grupo B (n=14) - grupo controle. Então foram coletadas duas amostras de sangue (5mL), após a primeira coleta, foram iniciados os procedimentos de fisioterapia respiratória nos pacientes do grupo A e, após 28 dias de aplicações de fisioterapia, uma nova amostra foi coletada e iniciou-se o processo de avaliação das concentrações de citocinas por meio do teste ELISA (Enzyme-linked immuno sorbent essay). **Resultados:** Observou-se que no primeiro momento, o grupo A apresentou altas concentrações de IL5, IL6 e IL10. Já no segundo momento, observou-se a significativa diminuição da concentração das citocinas e um aumento de IFN-γ. No grupo B, as citocinas permaneceram com níveis elevados. **Conclusão:** baseados nos resultados obtidos, o estudo sugere que as ações da fisioterapia respiratória influenciaram de forma relevante na resposta imunológica e também nos permite um entendimento aprimorado da resposta das citocinas em pacientes com leucemia linfoblástica aguda. Desta forma, percebe-se também que a imunologia pode ser uma grande aliada a fisioterapia na compreensão da resposta imunológica de pacientes portadores de LLA.

**Palavras-chaves:** Fisioterapia, Leucemia Linfoblástica, citocinas, ELISA.

## ABSTRACT

**Introduction:** Acute Lymphoblastic Leukemia - ALL is a hematological cancer that involves the proliferation, accumulation and infiltration of immature cells in the bone marrow. In addition, the disease depresses the respiratory system and the patient remains in bed while undergoing treatment with medications with high chemical content, the purpose of this study is to use the Respiratory Physiotherapy, which uses strategies, ways of prevention and treatment, assessing its influence over the immunological profile of leukemic patients through an immunoassay. **Objectives:** The study aims to evaluate the effects of Respiratory Physiotherapy in patients with ALL quantifying the concentrations of TH1, TH2 and inflammatory cytokines before and after the application of respiratory therapy. **Methods:** We selected patients from 08 to 50 years old, newly diagnosed, which were invited to participate in the project and after their consent, they signed a Consent Form - ICF, those were divided into two groups: group A (n = 14) - patients treated with respiratory therapy and group B (n = 14) - control group. Therefore we collected two blood samples (5 mL), after collecting the first blood sample, the respiratory therapy procedures were initiated in group A and, after 28 days of physical therapy applications, a new sample was collected and then we started the evaluation of cytokines concentrations through ELISA test (enzyme-linked immuno sorbent essay). **Results:** We observed that at first, group A showed high levels of IL5, IL6 and IL10. In the second stage, there was a significant decrease in the concentration of cytokines and an increase of IFN-γ. However, the cytokines of group B remained at high levels. **Conclusion:** Based on the results, the study suggests that the actions of respiratory therapy have a significant influence on the immune response and also allows us to understand about the enhanced response of cytokines in patients with acute lymphoblastic leukemia. Thus, clearly the immunology can be great help to physiotherapy in terms of allowing a better understanding about the immune response of patients with ALL.

**Keywords:** Physical Therapy techniques, lymphoblastic leukemia, cytokines, ELISA.

## INTRODUÇÃO

As leucemias são neoplasias derivadas de células hematopoéticas que proliferam a princípio na medula óssea, antes de se disseminarem para o sangue periférico, baço, linfonodos e outros tecidos(1). O quadro clínico das leucemias está relacionado com a queda do número de células sanguíneas, decorrente da proliferação de células neoplásicas (blastos) na medula óssea, ou com a imunossupressão causada pelas drogas citotóxicas no tratamento. Em decorrência deste fato ocorrem complicações em diversos sistemas: gastrointestinal, respiratório, geniturinário e nervoso, entre outros (2).

As complicações pulmonares nas leucemias podem ser divididas em manifestações associadas à infiltração pulmonar, linfonodal e pleural por células leucêmicas, e manifestações associadas ao tratamento quimioterápico, que têm como principais consequências infecções e hemorragia(3). Dentre as causas infecciosas, a pneumonia pode se desenvolver em cerca de 80% dos pacientes que apresentam leucemia aguda, especialmente durante o período de supressão da medula óssea(4).

O fenômeno da respiração processa-se pela integração dos pulmões ao sistema nervoso central e periférico, juntamente com a caixa torácica e músculos respiratórios. Este mecanismo pode ser alterado por doenças que acometam qualquer componente desse sistema (5). A fisioterapia respiratória contribui para prevenir e tratar vários aspectos das desordens respiratórias, tais como obstrução do fluxo aéreo, retenção de secreção, alterações da função ventilatória, dispnéia, melhora na performance de exercícios físicos e da qualidade de vida (6). Além disto, podemos encontrar diversos estudos relatando a eficácia das ações da fisioterapia em pacientes oncológicos. No entanto, observamos a carência de estudos associando a fisioterapia respiratória à resposta imunológica dos pacientes portadores de Leucemia Linfóide Aguda.

Este estudo objetivou analisar os efeitos imunológicos da fisioterapia respiratória em portadores de LLA, quantificando as citocinas TH1, TH2 e Inflamatórias pré e pós-cinesioterapia respiratória, por meio do Teste ELISA. As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, sendo produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteinoquinases ativadas por mitógenos. Diferentes tipos de células secretam a mesma citocina, e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células, fenômeno denominado pleiotropia. As citocinas são redundantes em suas atividades, ou

seja, ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas. Com frequência, são formadas em cascata, ou seja, uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas (7).

Sabendo que dentre os objetivos do tratamento fisioterapêutico na Leucemia está principalmente a diminuição dos sintomas da doença já instalada, buscando estabilizar o quadro dando uma melhor qualidade de vida ao paciente, a realização de um estudo, voltado para resultados comprobatórios da eficácia do tratamento fisioterapêutico na prevenção e tratamento de complicações respiratórias na população estabelecida no estudo, se fez necessária para responder satisfatoriamente se a fisioterapia poderia, de fato, influenciar o sistema de defesa do paciente, por meio de um dos testes mais conceituados: o teste ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ou ensaio de imunoabsorção ligado á enzima), o qual é muito utilizado por sua facilidade de automação, custo relativamente baixo em comparação a outros e elevada sensibilidade e especificidade (8), nos permitindo assim analisar as citocinas de forma eficiente.

## METODOLOGIA

Após a aprovação deste projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FHEMOAM, CAAE: 0029.0.112.000-10, em fevereiro de 2011, foram selecionados pacientes de 08 a 50 anos, recém-diagnosticados, os quais foram abordados e convidados a participarem do projeto. Ao consentirem, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, no qual constam todos os riscos, ainda que mínimos, da participação do indivíduo na pesquisa. Então os indivíduos foram divididos em dois grupos: Grupo A (n=14) e Grupo B (controle). Foi coletada uma amostra de 5ml de sangue periférico, sendo 14 amostras coletadas no primeiro momento e 10 no segundo momento (4 pacientes foram a óbito durante o período da pesquisa), as amostras então foram centrifugadas, geradas alíquotas e armazenadas a -70°C.

A pesquisa realizada foi de campo, descritiva, quantitativa, desenvolvida na enfermaria e no laboratório multidisciplinar da Fundação de Hemoterapia e Hematologia do Amazonas - FHEMOAM, durante um ano, a partir de Fevereiro de 2011 até fevereiro de 2012, A fisioterapia respiratória foi aplicada durante o período de internação, diariamente de 08:00 às 12:00, no turno matutino, com uma duração de trinta minutos, nos pacientes participantes do estudo, os quais precisavam estar internados e cadastrados na Fundação HEMOAM para indução de quimioterapia.

A inspiração - preferencialmente deve ter início a partir do Volume Residual (VR), já que nesse momento, as fibras dos músculos respiratórios tendem a estar

mais distendidas e, portanto, exige uma atividade significativa da musculatura respiratória global, sendo via oral no exercitador respiratório (usamos o Respirom por ser de baixo custo e lúdico) ativa e profundamente, sendo rápida no seu início e mantida ao final (ponto em que ocorre o maior incremento do trabalho respiratório (9).

A pressão expiratória (PE), também chamada de Terapia Expiratória Manual Passiva(10, 11) ou Compressão Expiratória (12), consiste em deprimir passivamente o gradil costal do paciente durante uma expiração forçada, sobretudo na fase final da expiração. Pode ser realizada com o paciente em decúbito dorsal, lateral ou sentado. Para sua realização, as mãos do terapeuta devem ser colocadas espalmadas com dedos abduzidos sobre o tórax, com os punhos e cotovelos fixos para a realização dos movimentos acompanhando a dinâmica da respiração e a movimentação rítmica das costelas. A pressão dada é contínua e proveniente dos ombros e braços, podendo, ao final, haver uma leve vibração para se obter maior relaxamento do paciente. Pode ser realizada em qualquer região da parede torácica, desde que as mãos se encontrem bem posicionadas (11). O objetivo principal da pressão expiratória é desinsuflar os pulmões.

A vibração A vibração é uma técnica de higiene brônquica que tem como objetivo mobilizar secreções já livres na árvore brônquica em direção aos brônquios de maior calibre, visando à expulsão de secreções (13). É uma aplicação manual com movimentos oscilatórios combinados a uma compressão aplicados no tórax do paciente, comumente usada por fisioterapeutas com o objetivo de remover secreções (14). A compressão e oscilação aplicadas durante a vibração produzem alguns mecanismos fisiológicos, tais como: aumento do pico expiratório; aumento expiratório do fluxo aéreo, carregando o fluxo de muco para a orofaringe; aumento do transporte de muco pelo mecanismo de diminuição da viscosidade da secreção, utilizando como ideal uma frequência entre 3-17 Hz; e a otimização do mecanismo da tosse via estimulação mecânica das vias aéreas. A vibração é aplicada manualmente no tórax durante a expiração após uma inspiração máxima(14). A vibração consiste em movimentos rítmicos rápidos e intensos, realizados

com as mãos espalmadas, acopladas, e com certa pressão no tórax do paciente. Tal manobra é realizada com intensidade suficiente para transmitir uma vibração em nível bronquial; o paciente deve estar em posição de drenagem postural, quando a mesma não for contraindicada(13,16,17). O fisioterapeuta coloca suas mãos estendidas sobre a região do tórax do paciente onde há maior acúmulo de secreções; posteriormente efetua-se uma contração isométrica de ambos os membros superiores, sendo que o punho e o cotovelo devem permanecer fixos (13,18,19,17).

A expiração ocorre por via oral, até o nível do repouso expiratório. Portanto, faz-se necessário que o fisioterapeuta certifique-se de que o paciente esteja clinicamente controlado (bons sinais vitais), de forma que o aumento do trabalho não comprometa seu quadro, ou seja, responsável por algum desconforto.(9)

No primeiro dia de internação, foi coletada a primeira amostra de sangue e então foram iniciados os procedimentos de fisioterapia respiratória e, após 28 dias de aplicação (período compreendido de internação do paciente na enfermaria, perfazendo um total de 28 dias - fase de indução), foi coletada a segunda amostra do segundo momento para comparação. Para a avaliação e quantificação da concentração das citocinas IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12, TNF-alfa e IFN-gama, foi realizado o teste ELISA (Enzyme-linked immuno sorbent assay), utilizando-se os reagentes do kit BD OptEIA® (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA), específico para cada citocina, esta técnica (ELISA) é um dos métodos de dosagem de citocinas de alta sensibilidade e especificidade e faz parte das atuais técnicas padrões para pesquisa e aplicações clínicas como por exemplo no diagnóstico de várias doenças que induzem a produção de imunoglobulinas (20). Vale ressaltar que cada passo do teste foi seguido rigidamente e registrado.

No que tange à dosagem de Citocinas Circulantes em Sangue Periférico, foram quantificada a concentração sérica das citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL12, IFN gama e TNF- $\alpha$  em pg/mL através da metodologia ELISA, utilizando os reagentes do kit BD OptEIA® (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA), específico para cada citocina (conforme Tabela 1).

Tabela 1: Composição, preparo e quantidade necessária das soluções usadas no ELISA para dosagem de citocinas séricas.

Reagente	Componentes e preparo	Observações
Tampão de Cobertura	Carbonato de Sódio 0,1M com pH 9,5 (8,40g NaHCO <sub>3</sub> , 3,56g NaCO <sub>3</sub> ) – Completar para 1000 mL com água destilada (ou 2,52g NaHCO <sub>3</sub> , 1,068g NaCO <sub>3</sub> – Completar para 300mL com água destilada, para preparar um volume menor)	2mL por placa. Conserva-se na Geladeira e utiliza-se em até 7 dias

Anticorpo primário	Específico para cada citocina	Conforme a quantidade de placas a fazer
PBS 10X	80,0g NaCl, 11,6g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2,0g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,0g KCL, Água destilada q.s.p. 1L; pH 7,0 (PBS Concentrado ou 10X)	Conservar na Geladeira; validade de 1 ano
PBS 1X	900 mL de água destilada + 100 mL PBS 10X	
Diluyente de Ensaio	32 mL PBS 1X com 3,2 mL Soro bovino Fetal; pH 7,0	Para uma placa. Recém-preparado.
Tampão de Lavagem	PBS 1X com 0,05% de Tween-20 (p.ex.: 500mL de PBS 1X + 250µL de Tween-20)	para uma placa. Recém-preparado.
Citocina Padrão	Solução de trabalho, após reconstituição do liofilizado. (IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN e TNF)	Retirar apenas o volume necessária para o primeiro tubo da curva de diluição.
Anticorpo secundário	Específico para cada citocina	Conforme a quantidade de placas a fazer
Solução de Substrato	Substrato A (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) + Substrato B (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina ou TMB)	Misturados 1:1, 15 minutos antes da aplicação (12 mL da solução por placa).
Revelador da Amostra/ Detector de Trabalho	Anticorpo secundário em diluyente de ensaio + reagente SAv-HRP	Adicionar SAv-HRP 15 minutos antes da aplicação.
Solução de Bloqueio	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 1M ou H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2M	5 mL para cada placa

Os reagentes usados no ELISA foram o tampão de cobertura (ou tampão de ligação), PBS 10X (Phosphate-Buffered Saline, 10 vezes concentrado, que é a solução estoque), PBS 1X (solução de trabalho), diluyente de ensaio (à base de PBS 1X e soro fetal bovino), tampão de lavagem (à base de PBS 1X e Tween 20%), solução de trabalho do padrão de cada citocina, de cada anticorpo primário, e solução de bloqueio (ácido fosfórico 1M ou, preferencialmente, ácido sulfúrico 2M). A Tabela 1 expõe a composição e o preparo das soluções.

Foram utilizadas microplacas de 96 poços (Figura 3) sensibilizadas com 100µL de Anticorpo de Captura (anticorpo primário) diluído em Tampão de Cobertura, conforme orientação do kit de cada citocina (para IL4, diluição 1:500; para as demais citocinas, diluição 1:250). As placas foram envoltas com papel laminado e incubadas overnight a 4°C.

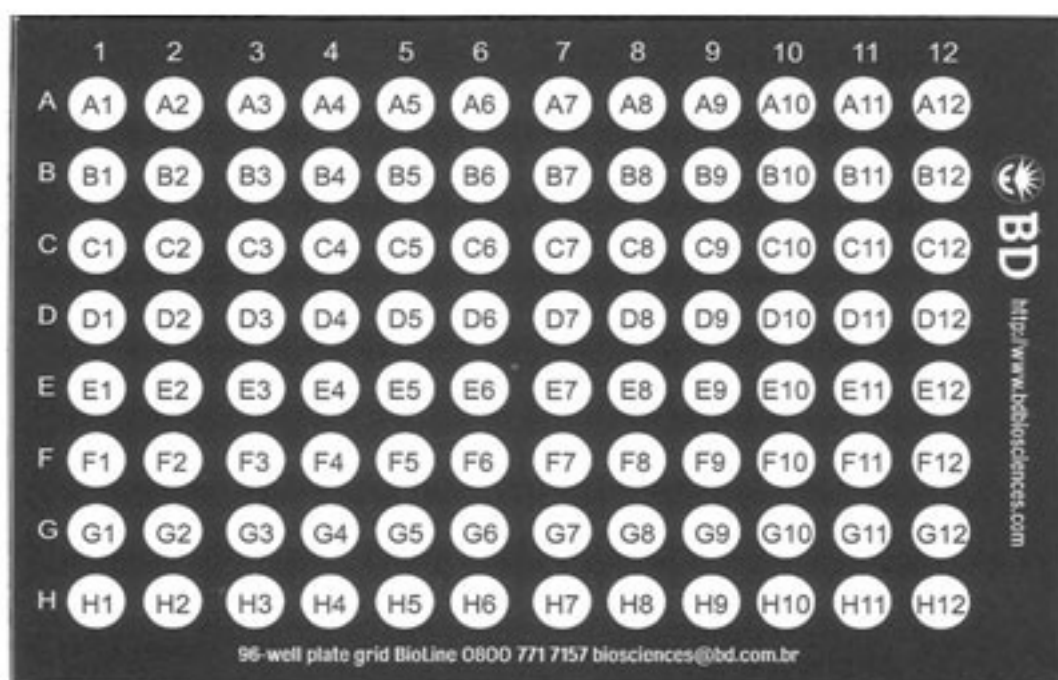


Figura 3: Ilustração de uma microplaca de ELISA com 96 poços.

1 Streptavidine-Horseradish Peroxidase, um conjugado de anticorpo monoclonal de camundongo contra Imunoglobulina G humana, marcado com peroxidase de rábano silvestre (*Armoracia rusticana*).



A placa foi, então, novamente aspirada e lavada, porém com 5 ciclos de lavagens nesta etapa. Será preparada a solução reveladora (anticorpo secundário + reagente SAV-HRP) específica para cada citocina e serão aplicados 100µL em cada poço. A placa foi envolta com papel laminado e incubada à temperatura ambiente por mais 1 hora, sendo possível notar a coloração azulada nos poços em que ocorrerá a reação (cuja intensidade é proporcional à tonalidade do azul).

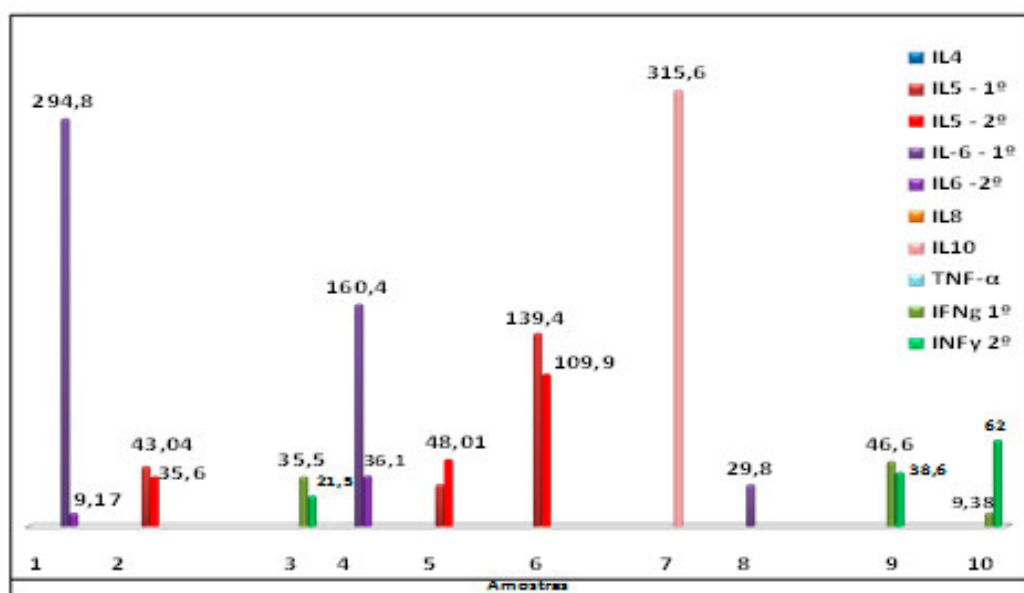
Terminado este período, a placa foi aspirada e lavada novamente, porém com 7 ciclos no total. Serão adicionados 100µL de Solução de Substrato em cada poço. A placa foi novamente envolta com papel laminado e incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, será acrescentada 50µL de Solução de Bloqueio em cada poço, finalizando a reação. A absorbância de luz a 450nm foi medida em até 30 minutos após a parada da reação, em leitora automatizada Expert Plus Microplate Reader (Asys HITECH), com geração de análises e gráficos de correlação logarítmica entre a absorbância de luz e a concentração sérica de cada citocina.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na análise das citocinas: IL4, IL5, IL8, IL10, IL12, IFN-gama, TNF-alfa, de forma isolada e global (Gráfico 1), submetidas ao teste ELISA, notamos no primeiro momento os altos índices de IL5, IL6 e IL10. Já no segundo momento, observamos a relevante diminuição da concentração das citocinas e aumento de IFN-γ. Também observamos que a IL4 não obteve concentração suficiente para a leitura da placa e que os pacientes os quais correspondem a amostra 7 e 8, obtiveram altas concentrações de IL5, IL6 e IL10, tais paciente foram a óbito por motivo de infecções adquiridas no meio hospitalar, conforme abordado anteriormente sobre as citocinas em grande proporções.

Quanto a citocina IL12, foram realizados dois testes de técnica ELISA, mas as concentrações, ainda que diluídas na segunda vez, foram superiores a 500pg/ml, foi necessária a realização de uma terceira tentativa para obter dados que obedeçam a curva padrão e assim ter números fidedignos desta citocina, mas não houveram resultados significativos. Vale ressaltar também que após o período de aplicação (28 aplicações), houve uma sensível diferença no quadro clínico do paciente, comparando os protocolos e evoluções médicas do primeiro e último dia de tratamento.

Gráfico 1. Análise comparativa das citocinas em pacientes com LLA tratados com fisioterapia respiratória



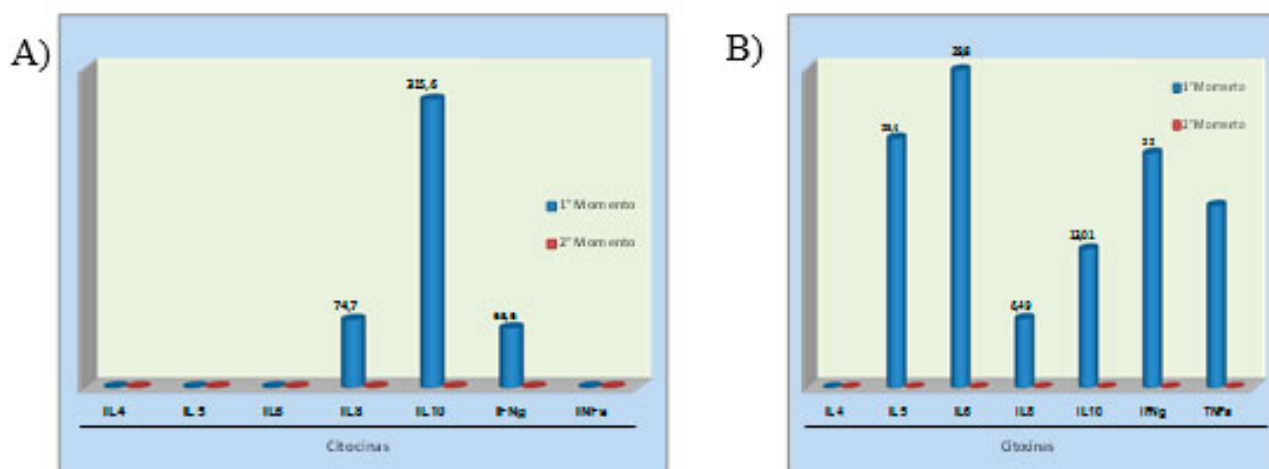
De acordo com os resultados obtidos através da técnica do teste de ELISA, podemos observar que as amostras 1, 4 e 8 revelam as maiores concentrações de IL-6 em relação às demais amostras. Segundo Naoum (21), a interleucina 6 participa na resposta de neutrófilos, atuando na fase aguda de uma infecção, além de que a produção de IL6 mutantes por células cancerígenas é um fator que contribui para o crescimento de linfócitos B leucêmicos, este resultado sugere que a defesa imunológica dos indivíduos em questão estava atuando no controle de uma inflamação aguda, provavelmente pelas características da própria patologia instalada (Leucemia Linfocítica Aguda), ativando a defesa do corpo em grande proporções conforme observamos na amostra 1 (concentração de IL6 igual a 294,8 pg/mL) (Gráfico 01).

Também no gráfico 01, observamos uma elevada concentração de IL-4 e IL-10 na amostra 7. De acordo com Kraychete (22), a IL-4 regula reações imunes mediadas por IgE e por mastócitos, que tem por função armazenar potentes mediadores químicos da inflamação aguda (como a histamina, heparina e serotonina) e fatores quimiotáticos para neutrófilos, os quais são as primeiras células a migrar para os sítios de infecção e desempenham importante papel na defesa contra vários micro-organismos. Segundo Sommer (23). A IL-4 é uma glicoproteína com propriedades anti-inflamatórias e produzida por linfócitos-T-CD4, mastócitos, eosinófilos e basófilos. Tem ação sobre os linfócitos-T e B, células NK, mastócitos, sinoviócitos e células endoteliais, usando a via JAK/STAT. Induz a diferenciação de linfócitos-B para produzir IgG e IgE, que são imunoglobulinas importantes nas respostas alérgicas e anti-helmínticas. Atua sobre macrófagos ativados, reduzindo os efeitos das citocinas IL-1, FNT $\alpha$ , IL-6 e IL-8, e inibindo a produção de radicais livres de oxigênio. Além disso, aumenta a suscetibilidade dos macrófagos aos efeitos dos glicocorticoides (23,24). A IL-4 tem potencial terapêutico em muitas situações clínicas, como, por exemplo, em psoríase, osteoartrite, linfoma e asma (25,26).

Relatos de Naoum (21) descrevem a IL-10 como uma citocina anti-inflamatória secretada pelos linfócitos T auxiliares – tipo 2 (TH2) com a função de regular a resposta imune e inibindo reações alérgicas. Ou seja, a Interleucina 10 participa na modulação de padrão TH2, inibindo a histamina e a função dos macrófagos. Este dado propõe que o sistema imune do paciente estava mediando as reações imunes com grandes estímulos, visando combater uma provável inflamação na fase aguda, pois a LLA deprime o sistema imune do paciente, deixando-o suscetível à ação de microorganismos patogênicos, como observado na amostra 7 (concentração de IL-10 igual a 315,6 pg/mL) no Gráfico 2.

O paciente 7 (Gráfico 2 A) e o paciente 8 (Gráfico 2 B) foram a óbito antes do término da pesquisa, ficando impossibilitada a coleta da segunda amostra.

Gráfico 2: Quantificação de citocinas em pacientes com LLA. A) Concentração de citocinas na amostra 7. B) Concentração de citocinas na amostra 8.



A citocina IL-5 é a terceira citocina com maior concentração em comparação às outras amostras analisadas, como podemos observar nas amostras 2, 5 e 6 (Gráfico1). De acordo com Silva (26), a IL-5 é uma citocina ativadora de eosinófilos e serve como ligação entre a ativação das células T e a inflamação alérgica eosinofílica. É produzida pela subpopulação Th2 de células T CD4+ e por mastócitos ativados. A IL-5 é uma das mais importantes citocinas envolvidas com as manifestações clínicas das doenças de cunho respiratório. Alguns autores investigaram a habilidade da IL-5 em causar a migração de eosinófilos para a mucosa nasal in vivo.

Já Roboz (28), relata que a IL-5 é considerada a mais específica para a linhagem de eosinófilos, sendo essencial para a diferenciação terminal, crescimento, ativação e sobrevivência dessas células sanguíneas, consideradas como participantes das células efetoras na patogênese de doenças alérgicas (como Rinite Alérgica), exercendo seus efeitos patológicos através de uma variedade de funções (como adesão, quimiotaxia, degranulação, formação de produtos) que resultam em importantes alterações histológicas e fisiológicas como lesão tecidual, produção de muco, edema e broncoespasmo. Portanto, sabendo que a IL-5 está intimamente ligada à resposta do sistema imune (associado ao sistema respiratório), observamos que os pacientes com elevadas concentrações dessa citocina encontravam-se com dificuldades respiratórias e, ocasionalmente, agravamento do quadro de rinite alérgica.

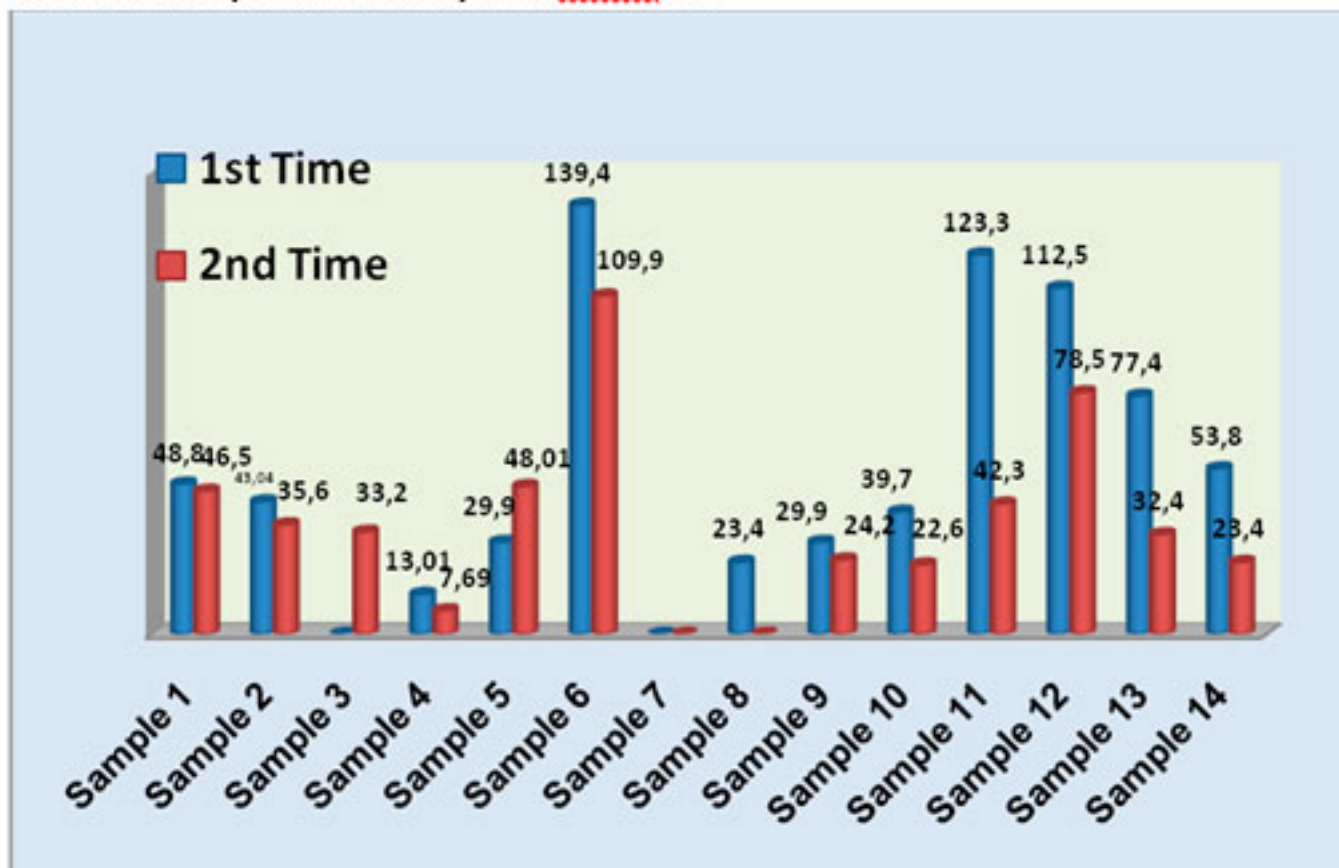
Também analisamos a concentração de IL12, porém todos os resultados foram superiores a 500 pg/ml, sendo esta concentração o ponto máximo da curva padrão. De acordo com Naoum(21), a Interleucina-12 é secretada por células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Estimula a produção de interferon-gama (IFN-g) pelos linfócitos T-auxiliares tipo 1 (TH1) e pelas células NK e as mutações na IL-12 produzem variantes que induzem a infecção por micobactérias (tuberculose - uma patologia respiratória que o leucêmico está suscetível e pode complicar seu quadro respiratório e, conseqüentemente, sua recuperação) e maior susceptibilidade a infecções, ela também é responsável por promover uma resposta com padrão TH1, inibe a síntese de IgE, aumenta a função citolítica celular e faz parte da imunidade Inata e a Adaptativa.

Ao analisarmos as amostras 3, 9 e 10 (gráfico 1), observamos predomínio de IFN que segundo Naoum (21), tem por função ativar macrófagos, aumentar o poder fagocitário e ativar o sistema imune contra vírus. Sugere-se que a defesa imunológica dos indivíduos em estudo poderia estar combatendo algum microorganismo estranho ou patogênico por meio da ativação dos macrófagos, os quais realizariam por conseqüência a fagocitose visando combater o corpo estranho. O paciente portador de LLA encontra-se normalmente debilitado pela doença e o alto teor de medicação administrada e o grande período internado na fase de indução no hospital, ambiente propício para infecções para um organismo frágil, com a defesa debilitada.

Desta forma, pode-se entender a importância da fisioterapia respiratória para os pacientes, pois atuou como uma aliada a quimioterapia, na fase de indução e no seu processo de recuperação. No entanto, sugere-se a continuidade do estudo, para descobrir a fundo qual a implicância real da fisioterapia em outras neoplasias ou a mesma neoplasia, mas no estágio de manutenção, entre outras sugestões.

Conhecendo a especificidade do teste ELISA e do resultado comprobatório deste teste, o qual é utilizado como teste-padrão de dosagem de citocinas pelos principais autores da área de imunologia, devido à fácil automação e custo baixo em comparação a outros testes imunoenzimáticos de mesma complexidade, um dos objetivos seria dosar as citocinas com a intenção de mensurar o possível benefício imunológico do tratamento fisioterapêutico. Logo a seguir podemos observar por meio da ilustração do Gráfico 3 das concentrações de citocinas obtidas no dia 01 e dia 28.

Gráfico 3: Ilustração das concentrações de citocina IL5.





## CONCLUSÃO

Conforme o intuito do projeto, foi analisada a concentração das citocinas TH1, TH2 e inflamatórias, realizando a comparação do quadro geral dos pacientes no início do estudo, os quais encontravam-se bastante debilitados em termos de sistema respiratório, hipersecretivos, resfriados, com crises de rinite alérgica, entre outros, e ao analisar os resultados do teste ELISA, ao qual as amostras foram submetidas, notamos no primeiro momento os altos índices de IL5, IL6 e IL10, o que demonstra que o sistema imune do paciente estava mediando possíveis reações alérgicas e infecções virais, de acordo com o quadro inicial observado no início do projeto. Já no segundo momento, observamos a relevante diminuição da concentração das citocinas e aumento de IFN- $\gamma$  o que sugere que a fisioterapia diminuiu o possível processo inflamatório do qual as citocinas atuavam, aumentando a resposta imune, conforme o aumento do IFN $\gamma$ , auxiliando na defesa imunológica, acelerando o processo de recuperação do corpo aos efeitos da patologia instalada e às altas concentrações de fármacos.

Além disso, observamos que a IL4 não obteve concentração suficiente para a leitura da placa e que os pacientes que correspondem a amostra 7 e 8, obtiveram altas concentrações de IL5, IL6 e IL10, tais paciente foram a óbito por motivo de infecções adquiridas no meio hospitalar e o como o organismo estava altamente debilitado, o controle imunológico não teve ação efetora suficiente para combater essas infecções, o que podemos observar desde o primeiro dia na primeira amostra coletada, conforme abordado anteriormente sobre as citocinas em grande proporções, o que nos sugere o organismo estava reagindo ao estado patológico, com elevada concentração de citocinas, conforme observamos os valores significativos (Gráfico 1). Quanto a citocina IL12, foram realizados dois testes de técnica ELISA, mas as concentrações, ainda que diluídas na segunda vez, foram superiores a 500pg/ml, tornando-se necessária a realização de uma terceira tentativa para obter dados que obedeçam a curva padrão e assim ter números fidedignos desta citocina e ainda assim, os números não foram significantes.

Desta forma, percebemos que a fisioterapia foi uma ferramenta auxiliar no tratamento do paciente leucêmico internado na FHEMOAM, houve a melhora da resposta do sistema imunológico, podemos observar de forma quantitativa e qualitativa, segundo os resultados do teste ELISA. Sabemos que ainda há a necessidade de outros estudos, sendo o presente estudo preliminar e inovador a respeito do assunto (Fisioterapia x Imunologia x Leucemia). Portanto, propomos que seja dado continuidade ao estudo com o

intuito de entender o processo o paciente em fase de manutenção, por exemplo, e assim obter resultados mais aprofundados a respeito do assunto e melhor compreensão do feedback imunológico de pacientes leucêmicos, visando não somente ajudar o paciente leucêmico, mas também contribuir com a comunidade científica e a sociedade em geral.

Primeiramente, gostaríamos de agradecer aos nossos professores orientadores por nos permitirem participar de um projeto tão relevante para a Fisioterapia e colaboraram grandemente para o nosso crescimento profissional, aos profissionais do Laboratório Multidisciplinar da FHEMOAM, aos mestrandos e doutorandos do DEP, por nos treinarem na rotina de laboratório. Agradecemos também à FAPEAM, a qual fomentou esse projeto e à FHEMOAM que concedeu profissionais de coleta e nos permitiu utilizar suas dependências para que esse estudo acontecesse da melhor forma possível.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SCHEINBERG DA, Golde DW. As leucemias. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, eds. Harrison medicina interna. 13<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, RJ: McGraw-Hill, 1994:1849–59.
2. OLIVEIRA, Ana Paola de; MARCHIORI, Edson; SOUZA JÚNIOR, Arthur Soares. Comprometimento pulmonar nas leucemias: avaliação por tomografia computadorizada de alta resolução. Radiol Bras São Paulo, v. 37, n. 6, p. 405-12, 2004.
3. KLATTE EC, Yardley J, Smith EB, Rohn R, Campbell JA. The pulmonary manifestations and complications of leukemia. Am J Roentgenol Radium Ther. Nucl Med 1963;89:598–609.
4. MCLOUD TC, Naidich DP. Thoracic disease in the immunocompromised patient. Radiol Clin North Am 1992;30:525–54.
5. LAGHI F, Tobin MJ. Disorders of the respiratory muscles. Am J Respir Crit Care Med. 2003; 168(1):10-48.
6. GOSSELINK R. Physical therapy in adults with respiratory disorders: where are we? Rev Bras Fisioter. 2006;4(10):361-72.
7. LIN E, Calvano SE, Lowry SF – Inflammatory cytokines and cell response in surgery. Surgery, 2000;127:117-126.
8. WHO website: <http://www.who.int/rabies/hu->

man/enzymeimmunoassay/en/

9. PRESTO, B.; PRESTO, L. D. de N. Fisioterapia respiratória: uma nova visão. Rio de Janeiro: Editora Bruno Presto, 2003.
10. AZEREDO CAC. Fisioterapia respiratória no hospital geral. São Paulo: Manole; 2000.
11. TECKLIN JS. Positioning, percussing, and vibrating patients for effective bronchial drainage. *Nursing*. 1979; 9(3):64-71.
12. FRANCHI A, Mafia AC. Fisioterapia respiratória. In: Júnior J. Assistência ventilatória mecânica. São Paulo: Atheneu; 1995.
13. MAYER AF, Cardoso F, Velloso M, Ramos R. Fisioterapia respiratória. In: Tarantino AB. Doenças pulmonares. 5a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.p.536-8.
14. ELKINS MR, Jones A, van der Schans C. Positive expiratory pressure physiotherapy for airways clearance in people with cystic fibrosis In: The Cochrane Library, Issue 1. Chichester: Wiley; 2004.
15. MCCARREN B, Alison JA. Physiological effects of vibration in subjects with cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2006; 27(6):1204-9.
16. IMLE PC. Percussão e vibração. In: MacKenzie CF, Ciesla N. Fisioterapia respiratória em unidade de terapia intensiva. São Paulo: Panamericana; 1988. p.89-98.
17. PRYOR JA, Parker RA, Webber BA. A comparison of mechanical percussion as adjuncts to postural drainage in treatment of cystic fibrosis in adolescents and adults. *Physiotherapy*. 1981; 67(5):140-1.
18. DOWNS AM. Clinical application of airway clearance techniques. In: Frownfelter DL, Dean E. Principles and practice of cardiopulmonary physical therapy. 3rd ed. St. Louis. Mosby; 1996.
19. COSTA D. Manobras manuais da fisioterapia respiratória. *Rev Fisiot Mov*. 1991; 1(4):11-25.
20. SANT'ANNA, Clemax Couto; FONSECA, Leila de Souza; SAAD, Maria Helena Féres. Relação entre o diagnóstico sorológico (ELISA) e a gravidade da tuberculose pulmonar na infância. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 34, n. 6, Dec. 2001.
21. NAOUM, P. C. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. *Revista Brasileira de Hemoterapia*, volume 23, nº 02, 2001.
22. KRAYCHETE, D.; e colaboradores. Citocinas Pró-inflamatórias e dor. *Rev Bras reumatol*, v.46, n.3, p. 199-206, mai/jun, 2006.
23. SOMMER C, White F - Cytokines, Chemokines, and Pain, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F et al. - *Pharmacology of Pain*. 1st Ed, Seattle, IASP Press, 2010;279-302.
24. CURFS JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA - A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev*, 1997;10:742-780.
25. KURTZ DM, Tschetter LK, Allred JB et al. - Subcutaneous interleukin-4 (IL-4) for relapsed and resistant non-Hodgkin lymphoma: a phase II trial in the North Central Cancer Treatment Group, NCCTG 91-78-51. *Leuk Lymphoma*, 2007;48:1290-1298.
26. YORIMITSU M, Nishida K, Shimizu A et al. - Intra-articular injection of interleukin-4 decreases nitric oxide production by chondrocytes and ameliorates subsequent destruction of cartilage in instability-induced osteoarthritis in rat knee joints. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008;16:764-771.
27. SILVA, Tarcimara Moreira da. S586p. Perfil das citocinas IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- $\gamma$  analisadas por RT-PCR em tecido de mucosa nasal de pacientes portadores de rinite alérgica/ Tarcimara Moreira da Silva. Belo Horizonte, 2007. 56 f., il.
28. ROBOZ, G.J. and S. Rafii, Interleukin-5 and the regulation of eosinophil production. *Curr Opin Hematol*, 1999. 6(3): p. 164-8.

1-Fisioterapeuta pós-graduanda em Fisioterapia Traumatológica, foi bolsista do Programa de Apoio à Iniciação Científica, fomentado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas, atuou na enfermaria da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - FHMOAM, [camila.fisio1@gmail.com](mailto:camila.fisio1@gmail.com)

2-Fisioterapeuta pós graduada em Saúde Coletiva, foi bolsista do Programa de Apoio a Iniciação Científica, fomentado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas - FAPEAM, atuou na enfermaria da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - FHMOAM, atualmente atua no Hospital Naval de Ladario-Marinha do Brasil, [almireneamirato@gmail.com](mailto:almireneamirato@gmail.com).

3-Fisioterapeuta e Professora Mestre. Fisioterapeuta da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - FHMOAM. [erbeniaaraujo@hotmail.com](mailto:erbeniaaraujo@hotmail.com)

Farmacêutica Bioquímica e Professora Doutora em Imunologia Básica e Aplicada, Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, [viana\\_lauramaia@yahoo.com.br](mailto:viana_lauramaia@yahoo.com.br)

4-Professor Doutor. Instituto Amazonense de Aprimoramento em Ensino em Saúde - IAPES. [xavierdaniel@hotmail.com](mailto:xavierdaniel@hotmail.com)