

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

PRISCILLA FRÓES SEBBE

“ESTUDO DA EFICÁCIA DO LED- TERAPIA VS FOTOTERAPIA CONVENCIONAL
FLUORESCENTE NO TRATAMENTO DE HIPERBILIRRUBINEMIA EM RATOS
WISTAR”

São José dos Campos, SP
2007

Priscilla Fróes Sebbe

“ESTUDO DA EFICÁCIA DO LED- TERAPIA VS FOTOTERAPIA CONVENCIONAL
FLUORESCENTE NO TRATAMENTO DE HIPERBILIRRUBINEMIA EM RATOS
WISTAR”

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Guillermo Jose Balbin Villaverde.

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Renata Amadei Nicolau

São José dos Campos, SP
2007

S449e

Sebbe, Priscilla Frões

Estudo da eficácia do LED-terapia vs fototerapia Convencional Fluorescente no tratamento de hiperbilirrubinemia em ratos Wistar / Priscila Frões Sebbe; Orientador: Prof. Dr. Antonio Guillermo Jose Balbin Villaverde, Co-Orientadora: Profa. Dra. Renata Amadei Nicolau. São José dos Campos, 2007.

1 Disco laser: Color

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2007

I Fototerapia 2. Hiperbilirrubinemia Neonatal 3. LED 4. Ducto biliar comum I. Balbin Villaverde, Antonio Guillermo Jose, Orient., II Nicolau, Renata Amadei, co-orient. III. Título.

CDU: 62:61

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

Assinatura do aluno: *Priscilla Frões Sebbe.*

Data da defesa: 18/12/2007.

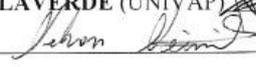
PRISCILLA FRÓES SEBBE

**“ESTUDO DA EFICÁCIA DO LED-TERAPIA VS FOTOTERAPIA
CONVENCIONAL FLUORESCENTE NO TRATAMENTO DE
HIPERBILIRRUBINEMIA EM RATOS WISTAR”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof.^a Dra. **RENATA AMADEI NICOLAU** (UNIVAP) 

Prof. Dr. **ANTONIO G. J. BALBIN VILLAVERDE** (UNIVAP) 

Prof. Dr. **NELSON VEISSID** (INPE) 

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 18 de dezembro de 2007.

Dedico o presente estudo aos meus pais (Reinaldo Sebbe e Carla V. Fróes), irmãs (Thatiana Fróes Sebbe e Maíra Fróes Meneses) e namorado e companheiro (Leandro dos Santos) pelos dias de aperto e desespero que seguiram de grandes realizações.

Ao meu grande MESTRE Doutor Antonio G.J. Balbin Villaverde. Sua determinação e atuação ética e profissional foram sempre estímulos e exemplos a serem seguidos.

À minha essencial colaboradora e amiga, MSc. Ana Maria Barbosa, não só pela parte experimental, mas sim por tudo e todos os conselhos.

À professora Dra. Renata Amadei Nicolau, por acreditar e me incentivar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela força e perseverança, e ao meu pai Reinaldo Sebbe, por ter-me proporcionado amor, estudo e aprendizagem.

Aos meus orientadores, Dr. Antonio G. J. Balbin Villaverde e Dra. Renata Amadei Nicolau, por acreditarem em mim e me proporcionarem esta experiência enriquecedora, tanto profissional como pessoal. Todo meu reconhecimento e gratidão.

Aos colaboradores:

-Professora MSc. Ana Maria Barbosa na realização da parte experimental com animais. Por sua disponibilidade e paciência inesgotáveis nas discussões científicas. Obrigada por tudo que me ensinou. Pelo aprendizado de toda experimentação animal e laboratorial;

-Prof. Dr. Nelson Veissid na realização da parte de caracterização do equipamento. Por me receber em seu laboratório e permitir um belíssimo trabalho já publicado;

-Dra. Márcia Elisa S. de Oliveira Ramos, Biomédica responsável pela parte de realização de exames laboratoriais de bilirrubina; e, também às suas funcionárias, Tecnóloga Érika Moraes Silva Almeida e à Biomédica Danúbia Diniz da Costa Takada. Por me aceitarem e receberem no laboratório e permitirem que a segunda etapa deste trabalho fosse realizada;

-Dr. Carlos Renê de Souza Silva, médico que nos emprestou carinhosamente o equipamento Convencional Fluorescente de fototerapia;

-Prof. Dra. Lais Gullo, no carinho de amiga, nos conselhos e dicas na língua portuguesa;

-Dr. Cláudio S. Meneses, médico responsável pela parte histológica e análise histológica, que posteriormente terminada, serão publicadas em revista indexada, com resultados importantes para complementação do estudo. Obrigada pelos dias em que me recebeu em seu laboratório, pelo coleguismo e dedicação;

-Engenheira Rúbia Lemes, na parceria do desenvolvimento do LED-terapia, uma conquista na qual somente nós duas sabemos! Muito obrigada por estar sempre presente em todas as dificuldades e barreiras!.

Às Instituições e seus colaboradores:

-Laboratório Antônio Afonso-Jacareí;

-INPE, Instituto Tecnológico de Pesquisas Espaciais - São José dos Campos;

-Hospital Infantil Pró-Infância- São José dos Campos;

-Laboratório CIPAX, Medicina Diagnóstica, patologia e citologia - São José dos Campos;

-EDEL Medical, Tecnologia e Desenvolvimento à Serviço da Saúde.

Às minhas amigas, Roberta Marcondes e Naiara Lopes, sempre presentes no meu dia-a-dia e aos colegas de trabalho, Leonardo Silveira Queiroz (aluno colaborador do laboratório da Profª. Renata), Professor Flávio Zambieri, Valéria (secretaria), Rúbia e Rosângela (biblioteca), Dona Neusa e Dona Ivone, todos participantes da evolução do meu trabalho, Muito Obrigada!

Às minhas famílias, **Fróes** e **Sebbe**, pela força e por acreditar no meu trabalho desenvolvido.

Ao meu namorado, Leandro Gustavo dos Santos, por todas as compreensões e carinho.

À CAPES, pela bolsa concedida, e

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização e conclusão deste trabalho.

“No meio de uma dificuldade,
Sempre existe uma oportunidade.”
(Albert Einstein)

SEBBE, Priscilla Fróes. **Estudo da eficácia do LED-terapia vs fototerapia Convencional Fluorescente no tratamento de hiperbilirrubinemia em ratos Wistar.** 2007. 63f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Biomédica, Departamento de Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2007. 1. CD-ROM.

Este trabalho descreve ensaios técnicos e experimentais realizados em laboratório com o equipamento LED-terapia desenvolvido para tratamentos de icterícia neonatal. A icterícia neonatal é caracterizada pela concentração elevada de bilirrubina, um pigmento orgânico produto da degradação das hemácias, no sangue do recém-nascido. A icterícia é uma condição clínica geral benigna e reversível, mas sua acentuação exagerada pode ocasionar seqüelas no sistema nervoso central. A fototerapia consiste na aplicação de luz de alta intensidade a qual promove transformação fotoquímica das moléculas de bilirrubina nas áreas expostas a luz com determinado comprimento de onda (400nm-500nm). A irradiância mínima considerada eficaz para tratamentos em neonatos é de $4\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$, sendo, porém o ideal que seja superior a $16\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$. Uma fonte de luz indicada para tratamento de icterícia é o uso de diodos LED, que são dispositivos simples, de baixo custo e que produzem baixo aquecimento. Os LEDs emitem luz com uma largura de linha espectral estreita e possuem um tempo de vida útil acima de 100.000 horas. Um equipamento que consiste em um colchão usando uma matriz com 88 LEDs azuis (pico de emissão em 472 nm) foi desenvolvido, sendo caracterizado opticamente e validado versus um equipamento de fototerapia Convencional comercial contendo de 7 a 8 lâmpadas fluorescentes. A irradiância espectral do sistema foi determinada com um espectroradiômetro USB2000, obtendo-se a uma distância de 10 cm da matriz o valor máximo de $77,0\ \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$. Também foi mapeada a distribuição espacial da radiação emitida pelos LEDs usando um detector fotovoltaico calibrado, construído no INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais). Para validação do equipamento foram realizados experimentos usando ratos Wistar machos, nos quais foi induzida uma hiperbilirrubinemia pela obstrução do ducto biliar comum. O equipamento LED-terapia nos prescreve uma queda da bilirrubina indireta de 78% no tempo de 8 h de tratamento comparado com apenas 39% utilizando o Convencional Fluorescente. Entanto que para um tempo de tratamento de 24 h a redução da bilirrubina foi de 92% e 76%, respectivamente. Na avaliação dos resultados obtidos pode-se concluir que o equipamento LED-terapia desenvolvido apresentou maior eficácia na fotodegradação das moléculas de bilirrubina em modelo animal, comparada à fototerapia Convencional Fluorescente, usada comercialmente.

Palavras - Chave: Hiperbilirrubinemia; Fototerapia; LED; Ducto biliar comum/patologia.

SEBBE, Priscilla Fróes. **Study of the efficiency of LED-therapy vs Conventional Fluorescent phototherapy for the treatment of hyperbilirubinemia in Wistar Rats**. 2007. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Biomédica, Departamento de Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José Dos Campos, 2007. 1. CD-ROM.

This work describes technical and experimental tests done using the LED-therapy equipment developed for neonatal jaundice treatment. The neonatal jaundice is characterized by an elevated bilirubin concentration, an organic pigment that is a sub product of the erythrocytes degradation, in the new-born blood. Jaundice is a clinical condition that is benign and reversible; but, in high concentration can provoke damage to the nervous central system. Neonatal phototherapy consist in the irradiation of a jaundice new-born with a high intensity light, in the spectral range of 400 to 500nm, to promote the photochemical transformation of the bilirubin molecules in the areas exposed to the light. The minimum spectral irradiância required for neonatal treatment is $4\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$, nevertheless the ideal value should be higher than $16\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$. A convenient light source for jaundice treatment can be obtained using blue LEDs, which are simple devices, low cost and they produce a low heating. They emit light with a narrow spectral linewidth and present a long life-time, well over 100,000 h. Equipment using an array with 88 blue LEDs (emission peak at 472 nm e 50 nm linewidth) was constructed, optically characterized and then validated versus an commercial equipment of phototherapy, containing 7 or 8 fluorescent lamps and known as the Fluorescent Conventional. The spectral irradiance of the system was measured using the spectroradiometer USB200, obtaining at a distance of 10 cm away from the LEDs array the maximum value of $77,0\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$. Likewise, the spatial distribution of the light emitted by the LEDs was mapped by using a calibrated photovoltaic sensor developed at the INPE laboratories (National Institute for Space Research of Brazil). For the equipment validation experiments were undertaken using male Wistar rats, for which the Hyperbilirubinemia was induced by the obstruction of the billi duct. With the LED-therapy equipment was obtained a reduction by 78% of the indirect bilirubin concentration against only 39% when using the commercial Fluorescent Conventional, both for 8h of treatment. For a 24h period, the reduction was 92% and 76%, respectively. It can be concluded from the results that the LED-therapy equipment is more efficient for photodegradation of the bilirubin molecules in animal model than the commercial system known as Conventional Fluorescent.

Key-words: Hyperbilirubinemia; Phototherapy; LED; Common Bile Duct/pathology

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Estrutura molecular da hemoglobina. | 19 |
| Figura 2: Processo estrutural do metabolismo da bilirrubina. | 20 |
| Figura 3: Mecanismo de geração e excreção da bilirrubina. | 21 |
| Figura 4: Equipamento de fototerapia Convencional Fluorescente..... | 26 |
| Figura 5: Utilização da fototerapia Convencional Fluorescente com a incubadora. | 27 |
| Figura 6: Visualização da parte inferior do equipamento de fototerapia Convencional Fluorescente..... | 27 |
| Figura 7: Equipamento LED-terapia. Vista lateral (A) e superior (B) do equipamento..... | 31 |
| Figura 8: Fotografia da fonte luminosa utilizada e o espectroradiômetro no centro da matriz. | 32 |
| Figura 9: Fotografia do equipamento LED-terapia, mostrando a régua usada para a medição das diferentes distâncias. | 32 |
| Figura 10: Fotografia do equipamento LED-terapia e o radiômetro desenvolvido. | 33 |
| Figura 11: Mapeamento da distribuição espacial da luz em diferentes planos paralelos. | 33 |
| Figura 12: Aplicação do LED-terapia nos animais com hiperbilirrubinemia. Vista do equipamento frontal (A), lateral (B) e em detalhe (C)..... | 36 |
| Figura 13: Aplicação da fototerapia Convencional Fluorescente nos animais com hiperbilirrubinemia. Vista superior (A) e lateral (B) do equipamento. | 37 |
| Figura 14: Espectrofotômetro Intertek..... | 38 |
| Figura 15: Distribuição espectral da irradiância emitida pela fonte luminosa para diferentes distâncias do equipamento LED-terapia. | 40 |
| Figura 16: Irradiância espectral dos equipamentos de LED-terapia e fototerapia Convencional Fluorescente, em função do comprimento de onda, ambos na distância de 45 cm. | 41 |
| Figura 17: Distribuição espacial da radiação a uma distância de 10 cm. | 42 |
| Figura 18: Distribuição espacial da radiação a uma distância de 30 cm. | 43 |
| Figura 19: A) animal icterico, B) animal normal. | 45 |
| Figura 20: Concentração de bilirrubina total nos diferentes grupos experimentais. | 46 |
| Figura 21: Concentração de bilirrubina direta nos diferentes grupos experimentais. | 47 |
| Figura 22: Concentração de bilirrubina indireta nos diferentes grupos experimentais. | 48 |
| Figura 23: Configuração de um LED..... | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Indicação de Fototerapia em RN sem doença hemolítica..... | 25 |
| Tabela 2: Indicação de Fototerapia em RN com peso inferior a 2500g. | 26 |
| Tabela 3: Indicação dos grupos experimentais. | 35 |
| Tabela 4: Análise dos dados de bilirrubina total, direta e indireta após LED-terapia e fototerapia Convencional Fluorescente. O nível de significância estatística foi estabelecido pela comparação entre o grupo LED-terapia e fototerapia Convencional Fluorescente. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média..... | 44 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- (RN) Recém-nascido
- (BI) Bilirrubina Indireta
- (BD) Bilirrubina Direta
- (BT) Bilirrubina Total
- (LDBC) Ligadura do Ducto Biliar Comum
- (UDPGT) Uridina Difosfato Glicuronil Transferase
- (nm) Nanômetros
- (PO) Pós-operação
- (PT) Pós-tratamento
- (p) probabilidade

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 Objetivo Geral | 17 |
| 1.2 Objetivos Específicos | 18 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 2.1 A Bilirrubina | 19 |
| 2.1.1 Bilirrubina não-conjugada ou bilirrubina indireta | 21 |
| 2.1.2 Bilirrubina conjugada ou bilirrubina direta | 22 |
| 2.2 Icterícia ou Hiperbilirrubinemia Neonatal | 22 |
| 2.3 Tratamentos para Hiperbilirrubinemia Neonatal | 23 |
| 2.3.1 A Fototerapia | 23 |
| 2.3.1.1 Efecácia da Fototerapia | 24 |
| 2.3.1.2 Indicação da Fototerapia | 25 |
| 2.3.1.3 Fototerapia Convencional Fluorescente | 26 |
| 2.3.1.4 Fototerapia utilizando LEDs | 28 |
| 2.4 Hiperbilirrubinemia experimental com vista ao desenvolvimento de novas modalidades de fototerapia | 28 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 30 |
| 3.1 Equipamentos emissores de luz para terapia em hiperbilirrubinêmicos | 30 |
| 3.1.1 Equipamento com LED-terapia | 30 |
| 3.1.2 Equipamento Convencioanl Fluorescente | 34 |
| 3.2 Animais | 34 |
| 3.3 Grupos experimentais | 34 |
| 3.3.1 Indução da Hiperbilirrubinemia: Procedimento Cirúrgico de Obstração do Ducto Biliar | 35 |
| 3.3.2 Intervenção terapêutica experimental | 36 |
| 3.3.3 Coleta e análise de Bilirrubina | 37 |
| 3.4 Análise estatística | 39 |
| 3.5 Eutanásia dos animais | 39 |
| 4 RESULTADOS | 40 |
| 4.1 Caracterização do equipamento LED-terapia e a comparação com a fototerapia Convencional Fluorescente | 40 |
| 4.2 Hiperbilirrubinemia Induzida | 44 |
| 5 DISCUSSÃO | 49 |
| 6 TRABALHOS FUTUROS | 53 |
| 7 CONCLUSÃO | 54 |
| REFERÊNCIAS | 55 |
| APÊNDICE A : O LED e suas limitações | 60 |
| ANEXO A: Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa | 62 |

1 INTRODUÇÃO

A icterícia neonatal é caracterizada pela concentração elevada de bilirrubina, um pigmento orgânico produto da degradação das hemácias no sangue do recém-nascido (RN) ⁽¹⁻⁵⁾. A icterícia se manifesta pela coloração amarelada da pele, escleróticas e membranas mucosas, pois há uma alta concentração de bilirrubina nesses locais, conseqüente de pigmentos biliares ^(2,5-9).

A icterícia é uma condição clínica geral benigna e reversível, mas seu agravamento pode ocasionar seqüelas no sistema nervoso central ^(1-3,5,8-10). Cerca de 80% dos RN podem apresentar algum grau de icterícia ⁽¹¹⁻¹²⁾.

A hiperbilirrubinemia neonatal é um fenômeno físico provocado pela pouca maturidade do fígado no organismo do neonato. É no fígado que se regula a concentração sérica e a degradação da bilirrubina. Se o mesmo não estiver homeostático, a quantidade de bilirrubina reabsorvida aumenta no sangue do RN ^(1,2,6,8,13,14). A geração e excreção da bilirrubina estabelecem algumas etapas, tais como: após a destruição das hemácias, o grupo heme é convertido em biliverdina e monóxido de carbono, uma reação catalisada pela enzima heme-oxigenase que é a etapa limitante na destruição do heme. A biliverdina é convertida em bilirrubina em uma reação catalisada pela biliverdina redutase. A bilirrubina é transportada pela corrente sanguínea ligada à albumina e captada pelos hepatócitos (células do fígado) onde ocorre a conversão da bilirrubina não-conjugada (bilirrubina indireta) em conjugada (bilirrubina direta). Esses compostos são excretados através do trato gastrointestinal. O fluxo da bilirrubina passa pelo sistema biliar, ducto biliar e canalículos biliares, percorre até o intestino, onde é excretada pela urina e fezes ^(1,2,8-10,13-15).

Preventivamente, o controle da hiperbilirrubinemia é realizado através de dois modos: fisicamente por exsanguíneotransusão, na qual o sangue do RN é substituído; ou fotoquimicamente, expondo o RN à radiação luminosa ^(3-6, 11,14-18).

A exposição da bilirrubina não-conjugada à luz acarreta a formação de fotoisômeros polares e de lumirrubina, que resulta na ciclização intramolecular. Esses compostos são excretados pelo fígado e rins sem conjugação, por serem compostos menos tóxicos e mais hidrossolúveis ^(5,8,10,11,14,19).

A fototerapia é o tratamento para icterícia neonatal que consiste na aplicação de luz de alta intensidade e comprimento de onda específico (400 a 500 nm), com finalidade de degradar a molécula de bilirrubina e aumentar a excreção da mesma ^(3-7,11,14,16,20).

A primeira aplicação clínica da fototerapia foi efetuada por Cremer et al. em 1958, que verificou um decréscimo na concentração da bilirrubina quando o RN era exposto à radiação luminosa emitida por uma unidade de fototerapia que utilizava lâmpadas fluorescentes (3-7,14-19,20-22).

A luz emitida pelos equipamentos de fototerapia penetra na epiderme e atinge o tecido subcutâneo. Desta forma, somente a bilirrubina que está próxima à superfície da pele (2 mm) é afetada diretamente pela luz⁽⁵⁾.

Na literatura, reportou-se que a dose terapêutica mínima de irradiância espectral corresponde a $4 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$, sendo, a ideal superior a $16 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$, uma vez que quanto maior a dose de irradiância, mais eficaz será a fototerapia (3-7,11,14-17,19,20).

Uma outra fonte de luz indicada para tratamento de icterícia é o LED (*Light Emitting Diode*), que é um dispositivo simples, de baixo custo, que opera com nível de tensão de 1,6 a 3,3V. A potência necessária para emissão de fótons está na faixa típica de 10 a 150 mW e produz baixo aquecimento. Os LEDs emitem luz com uma largura de linha espectral estreita, na ordem de 50 nm, e possuem um tempo de vida útil acima de 100.000 horas (19,20,23-29).

A fototerapia em que se utiliza LEDs para cura da hiperbilirrubinemia é muito recente. É necessário maior conhecimento sobre a ação dessa nova fonte de luz sobre o metabolismo do RN. Deve-se buscar o aprimoramento na aplicação de protocolos terapêuticos e desenvolvimento de novos equipamentos (30).

Para o estudo de novos protocolos terapêuticos e equipamentos visando à cura da hiperbilirrubinemia são necessários experimentos animais, contemplando quadros de icterícia induzida.

A Obstrução por Ligadura do Ducto Biliar Comum (LDBC) em ratos é um dos modelos experimentais mais utilizados para o estudo das doenças colestáticas e processos de hiperbilirrubinemia (31-33). A icterícia é a consequência mais visível da obstrução por LDBC e se manifesta quando a bilirrubinemia atinge os $3,5 \text{ mg/dL}$ (34,35). A seqüência de alterações histopatológicas e bioquímicas decorrentes da obstrução biliar no modelo de LDBC no animal já foi bem estabelecida por vários autores (2,31,33).

1.1 Objetivo Geral

Esta pesquisa se propõe ao estudo da eficácia do LED-terapia no tratamento de hiperbilirrubinemia em ratos Wistar.

1.2 Objetivos Específicos

- Caracterização do sistema LED-terapia;
- Comparação de características do LED-terapia vs fototerapia Convencional Fluorescente;
- Análise da bilirrubina total, direta e indireta.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Bilirrubina

A bilirrubina ($C_{33}H_{36}NaO_6$) é um pigmento que, normalmente, está presente no organismo em quantidades reduzidas ^(1,3,5,8,13,14). Sua principal fonte é a hemoglobina proveniente da quebra de eritrócitos maduros, a qual contribui com cerca de 80-85% da produção total. Dos restantes 15-20%, uma pequena proporção é proveniente da destruição prematura na medula óssea ou no baço de eritrócitos recém-formados e o maior componente é formado no fígado. A hemoglobina é uma proteína tetrâmera conjugada, composta de fração heme e globina. Consiste em quatro cadeias polipeptídicas de globina, sendo cada uma associada a um grupo heme dentro de uma capa hidrofóbica, como mostrado na figura 1 ^(1,2,8-10,14).

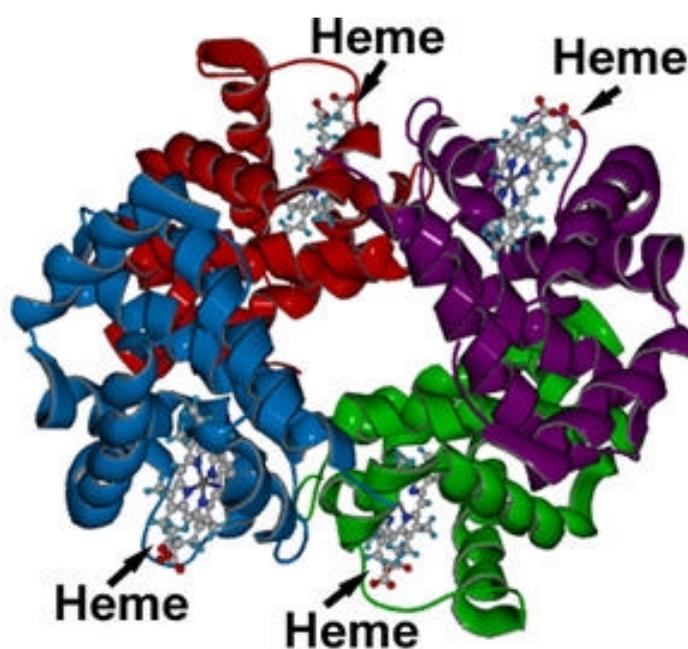


Figura 1: Estrutura molecular da hemoglobina.

Fonte: www.vcs.br/ccet/defg/naeq/material_didatico/textos_interativos_34.htm

A fração heme é uma molécula planar composta de protoporfirina IX tetrapirole contendo uma molécula de ferro central ^(1,2,8-10,13,14,36,37). Na figura 2 é mostrado o metabolismo da bilirrubina em processos estruturais.

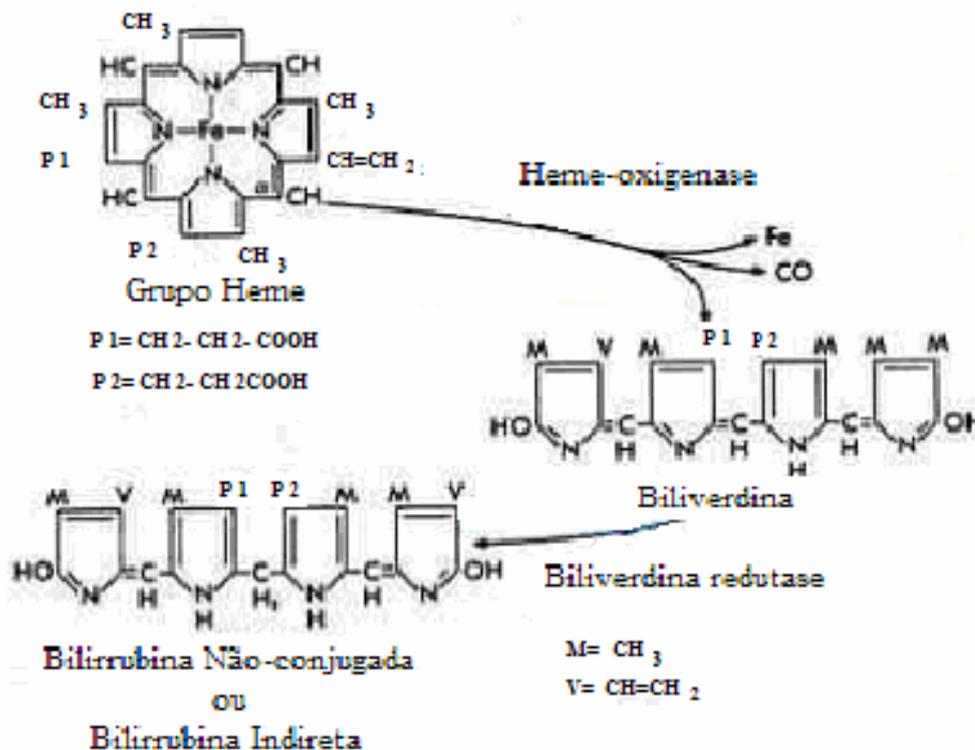


Figura 2: Processo estrutural do metabolismo da bilirrubina.
 Fonte: www.histo-line.it/ita/newsletter/2004/20041101.htm
 Adaptado por Sebbe, 2007.

A geração e excreção da bilirrubina estabelecem algumas etapas, tais como: após a destruição das hemácias, os eritrócitos são apreendidos pelo sistema retículo endotelial. O grupo heme é convertido em biliverdina e monóxido de carbono em uma reação catalisada pela enzima heme-oxigenase, que é a etapa limitante na destruição do grupo heme. A biliverdina é convertida em bilirrubina em uma reação catalisada pela biliverdina redutase (1,2,8-10,13,14,36,37). A bilirrubina assim formada é chamada bilirrubina não-conjugada ou indireta.

Como mostra a figura 3, a bilirrubina formada é transportada pela corrente sanguínea, e por ser lipossolúvel, liga-se à albumina para ser carregada até o fígado e nele ser captada pelas membranas do hepatócito. Dentro da célula liga-se a glicuranyltransferase a qual transportará a bilirrubina até o retículo endoplasmático liso, onde sofrerá conjugação, tornando a bilirrubina hidrossolúvel (bilirrubina conjugada). Após a conjugação, a bilirrubina vai para os canalículos biliares mediante mecanismo ativo ao atravessar a membrana dos hepatócitos chegando até o intestino. Esses compostos são excretados através do trato gastrointestinal (1,2,8,9,10,13,14,36,37).

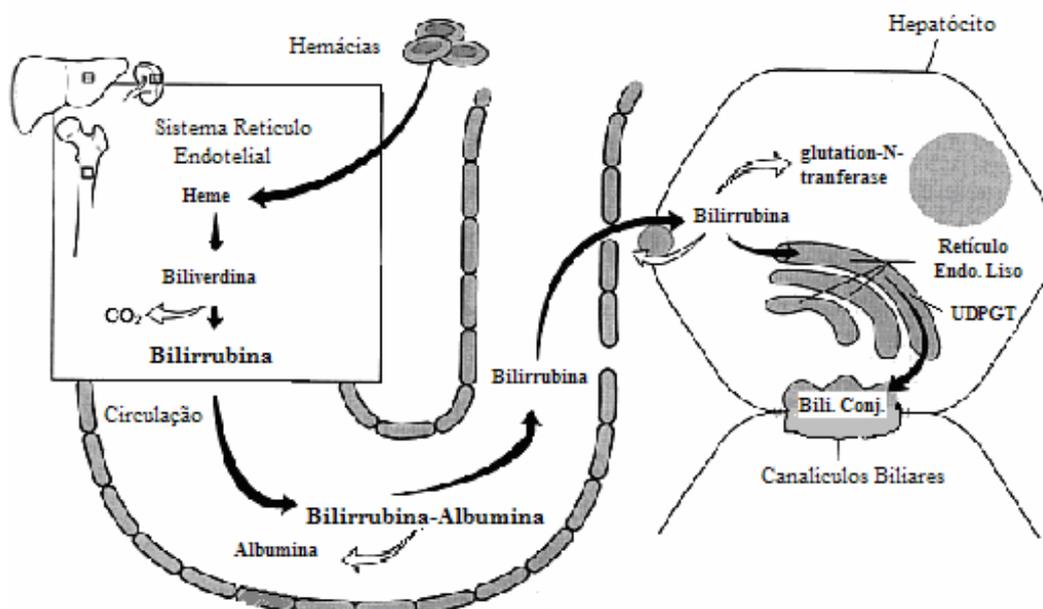


Figura 3: Mecanismo de geração e excreção da bilirrubina.

Fonte: Adaptado pelo autor, de: <http://www.hepcentro.com.br/gilbert.htm>

O fígado tem função importante no metabolismo da bilirrubina, sendo responsável pela sua captação, conjugação e excreção. A bilirrubina uma vez excretada do hepatócito é transportada dos canaliculos biliares para os ductulos, destes para os ductos interlobulares e destes para os ductos septais, e, assim, sucessivamente, até atingir os dois lobos do fígado (direito e esquerdo). Os dois ductos formam o ducto hepático comum, o qual, após unir-se com o ducto cístico e formar o ducto biliar comum, desemboca no duodeno ^(2,36).

A concentração sérica da bilirrubina representa um equilíbrio entre sua produção e a sua excreção; os níveis podem estar elevados em consequência da maior produção de bilirrubina ou da deficiência na excreção hepática. A concentração é composta da fração conjugada (direta) e da não-conjugada (indireta) ^(1,2,8-10,13,14).

2.1.1 Bilirrubina não-conjugada ou bilirrubina indireta

A bilirrubina indireta é produzida no sistema retículo endotelial, é apolar, insolúvel em água e é transportada para o fígado através da corrente sanguínea ligada à albumina, mas reversível a ela. A bilirrubina isolada da albumina entra na célula hepática (hepatócito) e, uma vez no citoplasma, se associa a glicuranyltransferase. O complexo bilirrubina-enzima é então transportado ao retículo endotelial liso, onde a enzima uridina difosfato glicuronil transferase (UDPGT) catalisa a rápida conjugação da bilirrubina ^(2,8).

2.1.2 Bilirrubina conjugada ou bilirrubina direta

A bilirrubina direta é produzida após o processo de conjugação, que é realizado no retículo endotelial liso. Esse processo de conjugação transforma a molécula não-polar da bilirrubina em uma mistura polar/não-polar que atravessa as membranas celulares. O derivado conjugado, solúvel em água, é excretado do hepatócito na forma de bile e constitui um dos pigmentos biliares. Devido à solubilidade em água, a bilirrubina conjugada é encontrada em pequenas quantidades tanto na corrente sanguínea como na urina. A excreção da bilirrubina é a fase final do processo ^(2,8).

2.2 Icterícia ou Hiperbilirrubinemia Neonatal

A icterícia no RN é uma patologia que se caracteriza pelo aumento da taxa de bilirrubina no sangue. Manifesta-se por uma coloração amarelada da pele e das mucosas, mais ou menos intensa, devido ao depósito de pigmentos biliares nos tecidos. Quando a bilirrubina se encontra em níveis elevados na corrente sanguínea dá-se o nome de hiperbilirrubinemia ^(1-6,8,9,20,21,36-38). A icterícia é clinicamente detectada quando a concentração sérica de bilirrubina no RN ultrapassa 2,0-3,0 mg/dL (valor normal: 0,3-1,0 mg/dL) ^(1-3,5,8-10,20,21,36).

A hiperbilirrubinemia indireta quando presente em valores elevados pode ultrapassar a barreira hematoencefálica e impregnar-se no sistema nervoso central desencadeando uma síndrome neurológica chamada Kernicterus, extremamente grave, que deixa seqüelas irreversíveis e com alta mortalidade ^(3,6).

A hiperbilirrubinemia inicia-se após 24 horas de vida. Como existe pouca ou nenhuma atividade da UDPGT no fígado do RN, há uma habilidade muito limitada para a conjugação da bilirrubina. Em RN com 9 meses completos de gestação (à termo) as concentrações de bilirrubina no soro estão ao redor de 4,0-6,0 mg/dL durante as primeiras 48h de vida extra-uterina. A incidência da hiperbilirrubinemia é muito maior entre prematuros e neonatos de baixo peso corporal. Crianças nascidas prematuramente (pré-termo) atingem uma concentração média de bilirrubina no soro entre 10,0-12,0 mg/dL, entre o 5º e o 6º dia de vida ^(3,5,6,14,15,20). Cerca de 25% a 50% dos RN desenvolvem valores séricos de bilirrubina maiores que 7,0 mg/dL ^(3,5,6,14,15,20).

São causas de hiperbilirrubinemia neonatal:

- A maior velocidade de produção de bilirrubina no RN;

- Hipoperfusão hepática devido à adaptação cardio-circulatória após o nascimento, com conseqüente débito de sua função excretora;
- Captação defeituosa da bilirrubina na corrente sanguínea provocada por ligandina diminuída ou por ligação de ligandina a outros ânions ;
- Conjugação defeituosa devido à diminuição da atividade da UDPGT;
- Estrogenização do RN: altos níveis circulantes de estrógenos no feto deprimem a capacidade de glicuronização da bilirrubina;
- Aumento da circulação êntero-hepática da bilirrubina. A flora bacteriana do intestino grosso é responsável pela hidrogenização da bilirrubina, enquanto o crescimento desta flora não se estabelece, há grande atividade da enzima betaglicuronidase, que leva a hidrólise da bilirrubina conjugada, de modo que o pigmento de reação indireta novamente se forma, sendo reabsorvido na mucosa intestinal, retornando à circulação sistêmica e exigindo nova conjugação em nível de hepatócito ^(3,5,6,14,15,20).

2.3 Tratamentos para Hiperbilirrubinemia Neonatal.

Atualmente existem diversas publicações relacionadas às formas de tratamento para a hiperbilirrubinemia neonatal. Porém, os tratamentos mais realizados são feitos através de dois modos: remoção mecânica, por exsanguíneotransusão, na qual o sangue do RN é substituído; ou aumentando a excreção da bilirrubina, fotoquimicamente, expondo o RN à radiação luminosa, a fototerapia ^(3,5,6,11,14-21,24,25).

2.3.1 A Fototerapia

A utilização da fototerapia como tratamento da hiperbilirrubinemia foi proposta pela primeira vez em 1958 por Cremer et al., construindo a seguir uma unidade fototerápica utilizando lâmpadas fluorescentes. Desde então novas técnicas e equipamentos de fototerapia foram desenvolvidos ^(3-5,7,14,15,17,21,24,39-41).

A fototerapia é o tratamento para hiperbilirrubinemia neonatal que consiste na aplicação de luz de alta intensidade com finalidade de degradar a molécula de bilirrubina e aumentar a excreção da mesma, devendo o RN ser exposto à radiação com determinado comprimento de onda ^(3-5,7,14,15,17,21,24,39-41).

A molécula de bilirrubina absorve energia luminosa no comprimento de onda entre 400 e 500 nanômetros (nm). A luz nesta faixa espectral penetra na epiderme e atinge o tecido subcutâneo, entretanto somente a bilirrubina que estiver próxima da superfície da pele será afetada diretamente pela luz e a eficácia da fototerapia dependerá da quantidade de energia liberada pela fonte luminosa ^(3-5,7,14,15,17,21,24,39-41). A exposição à luz da bilirrubina acarreta a formação de fotoisômeros polares e de lumirrubina, que resulta na ciclização intramolecular, sendo esses compostos excretados pelo fígado ^(5,14,17,21,41).

O princípio básico da ação da fototerapia é a transformação da estrutura da molécula de bilirrubina em produtos hidrossolúveis, passíveis de eliminação renal e hepática. Dois mecanismos têm sido propostos para explicar a ação da fototerapia na redução dos níveis séricos de bilirrubina: a fotoisomerização e a fotooxidação ^(5-7,14,41).

A Fotoisomerização ocorre no espaço extravascular na pele. Uma vez irradiada, a molécula de bilirrubina dá origem a dois tipos de isômeros o isômero geométrico ou configuracional e o isômero estrutural ou lumirrubina ^(5-7,14,41).

O isômero geométrico se forma rapidamente e é reversível à molécula de bilirrubina que lhe deu origem; entretanto sua excreção é muito lenta em RN ^(5-7,14,41).

Os isômeros estruturais, ou lumirrubina são gerados em forma mais lenta que isômeros geométricos, porém esta reação é irreversível. A lumirrubina, por ser solúvel em água, ao contrário da bilirrubina indireta, é rapidamente excretada pela bile e pela urina do RN, sem a necessidade de conjugação. A formação de isômeros estruturais é o mecanismo mais importante de diminuição da bilirrubina através da fototerapia ^(5-7,14,41).

O mecanismo de ação da Fotooxidação parece ter pouca contribuição na diminuição dos níveis séricos de bilirrubina. Consiste na oxidação de uma pequena fração das moléculas ativas da bilirrubina em ambiente aeróbico, levando à produção de complexos pirólicos, solúveis em água, que serão eliminados na urina ^(5-7,14,41).

2.3.1.1 Eficácia da Fototerapia

A eficácia da fototerapia depende da concentração sérica inicial da bilirrubina antes do tratamento, superfície corporal do RN exposta à luz, distância entre a fonte luminosa e o paciente, fluência ($DE=Pxt/A$, onde P é a potência, t é o tempo de aplicação da radiação e A é a área irradiada), irradiância espectral e comprimento de onda da radiação emitida pela fonte luminosa, além de características intrínsecas do RN como sinais de doença subjacente:

vômitos, letargia, dificuldade na alimentação, perda de peso excessiva, apnéia, taquipnéia, ou instabilidade da temperatura^(3-7,14-16,24,40).

A irradiância espectral mima para efeito terapêutico deve ser de $4 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$ ^(3,5,6), sendo porém o ideal que seja superior a $16 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$, já que quanto maior a dose mais eficaz será a terapia⁽⁶⁾. Entretanto, vários trabalhos demonstraram que a irradiância média dos aparelhos de fototerapia encontram-se muito abaixo da mínima requerida⁽³⁾. Sendo assim alguns insucessos da fototerapia podem ser causados por fontes de luz mal utilizadas, podendo ser evitado com um maior controle de manutenção e medição freqüente da irradiância através de um fotodosímetro^(38,39).

2.3.1.2 Indicação da Fototerapia

Os níveis de bilirrubina sérico somados ao quadro clínico do RN indicam o emprego da fototerapia, a qual tem a dose ajustada individualmente para cada caso. Os principais fatores a serem considerados, além do próprio nível de bilirrubina, incluem o tipo de icterícia, (hemolítica ou não), tempo de vida pós-natal, peso de nascimento, idade gestacional e fatores de risco para Kernicterus^(3,5,6,7).

Alguns autores indicam valores para utilização da fototerapia em função do tempo de vida extrauterina relacionado à concentração de bilirrubina sérica (Tabela 1)^(3,6).

Tabela 1: Indicação de Fototerapia em RN sem doença hemolítica.

| Tempo de vida (horas) | Bilirrubina total (mg/dL) |
|-----------------------|---------------------------|
| 24-48 | >15 |
| > 48 | >18 |
| 72-96 | >20 |
| >96 | >22 |

Fonte: “Assistência ao Recém Nascido de Risco”
Adaptado por Sebbe, 2007

Os RN com peso inferior a 2500g e com 24h de vida não são considerados saudáveis em relação aos valores de bilirrubina. RN com níveis de bilirrubina direta que ultrapassem 15-20% do valor de bilirrubina total não têm indicação de fototerapia (Tabela 2)^(3,6).

Tabela 2: Indicação de Fototerapia em RN com peso inferior a 2500g.

| Peso do RN (g) | Bilirrubina total (mg/dL) | | | |
|----------------|---------------------------|---------|---------|--------|
| | 24-48 h | 48-72 h | 72-96 h | > 96 h |
| <1500 | 6 | 8 | 8 | 8 |
| 1501-2000 | 8 | 10 | 10 | 10 |
| 2001-2500 | 12 | 14 | 14 | 14 |

Fonte: “Assistência ao Recém Nascido de Risco”
Adaptado por Sebbe, 2007

O método de aplicação consiste em expor o RN à radiação luminosa, nu e com apenas uma venda sobre os olhos. A distância entre o equipamento e o RN varia de acordo com a iluminação utilizada, se fluorescente, $\approx 45\text{cm}$, se halógena, $\approx 50\text{cm}$, etc. Como a intensidade da luz é inversamente proporcional ao quadrado da distância, a eficiência do método é menor quando a distância aumenta⁽⁴²⁻⁴⁶⁾.

2.3.1.3 Fototerapia Convencional Fluorescente

Na fototerapia convencional normalmente utilizam-se de 7 a 8 lâmpadas fluorescentes de 20W (Figura 4). A fototerapia convencional tem a vantagem de iluminar grande parte da superfície corporal do RN, com a desvantagem de emitir uma baixa irradiância quando utilizada lâmpadas do tipo “luz do dia” e outra desvantagem é a alta desidratação provocada pela associação de berço aquecido e a fototerapia^(4,5,7,11,42-48).

**Figura 4:** Equipamento de fototerapia Convencional Fluorescente.

Fonte: www.gigante.com.br/produtos/fototerapi_f_br.asp

Recomenda-se manter a fonte de luz a uma distância em média de 45 cm do paciente, pelo risco de lesão ocular e perigo de hiperaquecimento. A figura 5 mostra a fototerapia Convencional Fluorescente diretamente em contato com a cúpula superior da incubadora, tal posicionamento aumenta o calor dentro da incubadora sendo extremamente perigoso ao RN. O acrílico de proteção do equipamento mais a cúpula da incubadora também de acrílico diminuem a irradiância que chega ao RN, explicando em parte a baixa eficácia clínica observada com o uso de aparelhos convencionais de fototerapia ^(4,5,42-49).



Figura 5: Utilização da fototerapia Convencional Fluorescente com a incubadora.
Fonte: www.geocities.com/bebesano/neoicte.html

As lâmpadas fluorescentes disponíveis no mercado nacional emitem radiação na faixa do azul, cerca de 25% menor do que similares produzidas fora do país (Figura 6). Sendo assim, fototerapias convencionais equipadas com lâmpadas fluorescentes tipo “luz do dia”, apresentam baixa irradiância espectral (média de $3,5 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$), e conseqüentemente baixa eficácia clínica ^(3-6,42-49).



Figura 6: Visualização da parte inferior do equipamento de fototerapia Convencional Fluorescente.
Fonte: www.mp.pl/artykuly/?aid=24978

A irradiância é diretamente relacionada à distância entre a fonte de luz e o paciente. A irradiância em determinada banda de comprimento de onda é chamada irradiância espectral e é expressa em $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$. Os radiômetros ou dosímetros comercialmente disponíveis medem a irradiância em uma banda predeterminada. Os radiômetros são úteis com finalidade de controle de qualidade, para medir os níveis de irradiância de unidades de fototerapia e compara-los com os valores fornecidos pelos fabricantes⁽¹⁵⁾

Quanto mais próximo o paciente estiver da fonte emissora de luz maior a irradiância sobre a pele do RN. Nas condições da distância entre o paciente e a fototerapia convencional, utilizada na prática clínica, a irradiância varia de 2,5 a 4,5 $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$. Estas irradiâncias são inferiores as recomendadas na literatura para o tratamento de hiperbilirrubinemia neonatal⁽⁴²⁻⁴⁹⁾.

2.3.1.4 Fototerapia utilizando LEDs

O LED azul surgiu em meados dos anos 90, especificamente, em 1993. Estudos dos LEDs como fototerapia para tratamento da hiperbilirrubinemia foram descritos em meados do ano 2000; sendo necessários mais estudos sobre a ação desta fonte de luz na degradação e metabolismo das moléculas de bilirrubina, com vista a construir novos equipamentos de fototerapia mais eficazes^(19,23,25,28,29,50,51).

O desenvolvimento de novos protocolos e/ou equipamentos de fototerapia está na dependência de estudos envolvendo a fototerapia empregada a hiperbilirrubinemia experimental.

2.4 Hiperbilirrubinemia experimental com vista ao desenvolvimento de novas modalidades de fototerapia

Existem diversas maneiras para indução de hiperbilirrubinemia, por injeções de drogas, por mudança gênica e por obstrução do ducto biliar⁽³⁰⁻³⁴⁾.

A Obstrução por Ligadura do Ducto Biliar Comum (LDBC) em ratos é um dos modelos experimentais mais utilizados para o estudo das doenças colestáticas e hiperbilirrubinemia^(34,52). A seqüência de alterações histopatológicas e bioquímicas decorrentes da obstrução biliar no modelo de LDBC no animal adulto já foi bem estabelecida, podendo ser empregado para indução da hiperbilirrubinemia^(2,30-34,36,52-54). A icterícia

obstrutiva é a consequência mais visível da obstrução por LDBC e se manifesta quando a bilirrubinemia atinge os 3,5 mg/dL^(33,34).

Os distúrbios imunológicos provocados pela icterícia obstrutiva podem ser analisados sob três aspectos, muitas vezes interrelacionados:⁽³³⁾

- Ausência de bile na luz intestinal;
- Obstrução do fluxo biliar;
- Acúmulo de substâncias tóxicas (bilirrubina indireta).

A obstrução biliar resulta no acúmulo de substâncias que são normalmente excretadas pela via biliar. Assim, o comprometimento da excreção biliar leva à retenção sistêmica de substâncias tóxicas com os consequentes efeitos deletérios.

Lee em 1972 (apud Biondo-Simões, 1997)⁽⁵⁴⁾ relata ter trabalhado com ratos, onde se fez secção do ducto biliar comum entre ligaduras, tendo obtido obstrução permanente com icterícia de pele e colúria.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos emissores de luz para terapia em hiperbilirrubinêmicos

3.1.1 Equipamento LED-terapia

Foi desenvolvido um sistema óptico usando como fonte luminosa uma matriz de LEDs emitindo na faixa espectral do azul e adequado às normas internacionais IEC 60601-2-50 (International Electrotechnical Commission), que trazem prescrições de segurança e desempenho para equipamentos de fototerapia destinados ao tratamento de hiperbilirrubinemia neonatal ^(35,55).

O sistema óptico desenvolvido consiste em uma matriz de 88 lâmpadas LED conectadas em paralelo (8x11) inserida em um colchão de espuma anti-mofo, antialérgica e biocompatível. O colchão foi construído em formato retangular (20x14cm) que corresponde ao tamanho médio de um RN, com a finalidade de distribuir a irradiância num plano de projeção da luz em toda a superfície corporal exposta ⁽³⁵⁾.

As características do LED utilizado foram: modelo OSUB5131P (Optosupply, China), com 5mm de diâmetro, ângulo de abertura de 30°, comprimento de emissão com máximo em 472 nm e largura de linha de 50nm e intensidade luminosa média de 6250 mcd. A fonte de alimentação do equipamento foi de 5V, sendo a corrente em cada LED de 0,22 A. Nas figuras 7A e 7B são mostradas fotografias do equipamento LED-terapia ⁽³⁵⁾.

A



B



Figura 7: Equipamento LED-terapia. Vista lateral (A) e superior (B) do equipamento.

Para a caracterização do equipamento foram considerados alguns pontos da Norma IEC 60601-2-50, dentre os quais se destacam: a definição de uma banda espectral efetiva para o tratamento, compreendida entre os comprimentos de onda de 400 a 550 nm; a definição de um parâmetro de uniformidade para a distribuição da irradiância sobre o leito do RN e o estabelecimento de níveis máximos de irradiância para o ultravioleta e infravermelho, radiações essas nocivas para o neonato e não eficazes no tratamento ^(15,16,40).

Os ensaios contemplaram 2 tipos de experimento: medição da distribuição espectral de energia (luz) emitida pelo equipamento de fototerapia e a medição da distribuição da irradiância num plano de projeção ^(15,16,19,20).

Para medições da irradiância emitida foi utilizado um Espectroradiômetro USB 2000 da Ocean Optics Inc. (USA), pertencente ao INPE (Instituto Nacional de pesquisas Espaciais-São José dos Campos), com sensibilidade entre 339 nm e 1019 nm. A distância entre a fonte luminosa (colchão com a matriz de LEDs) e o detector (posicionado no centro da região iluminada), como mostra a figura 8, foram espaçadas de 10 em 10 centímetros de altura até 40 cm, por corresponder ao valor médio recomendado clinicamente aos equipamentos convencionais de fototerapia.

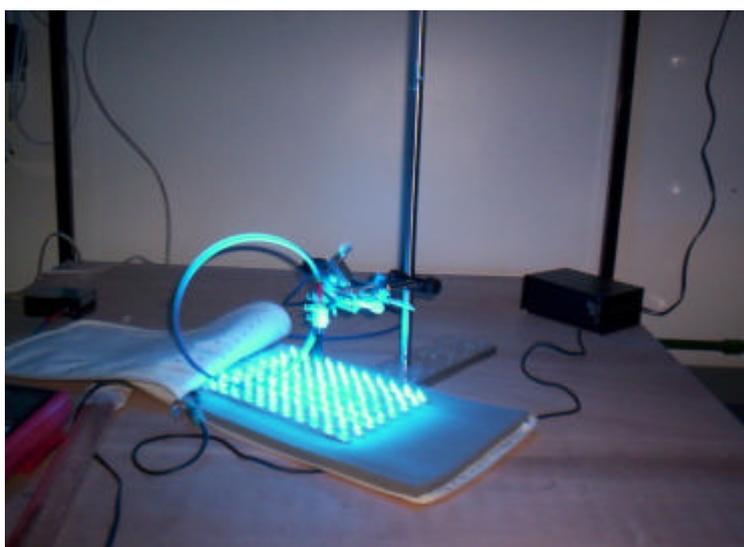


Figura 8: Fotografia da fonte luminosa utilizada e o espectroradiômetro no centro da matriz.

Na figura 9, pode-se visualizar o posicionamento da régua para as medições das diferentes alturas.

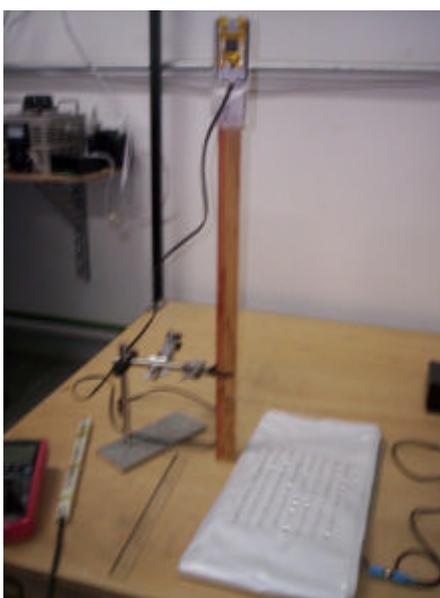


Figura 9: Fotografia do equipamento LED-terapia, mostrando a régua usada para a medição das diferentes distâncias.

Para a realização do mapeamento da distribuição espacial da luz em diferentes planos paralelos ao colchão foram utilizados, um radiômetro adequado para o sistema de luz LED construído no INPE e um multímetro Fluke 189 true RMS Multimeter. O sensor do radiômetro é uma célula solar de silício com resposta calibrada em 472 nm. Esta célula tem uma resistência “shunt” que transforma o valor da corrente da célula solar em tensão elétrica, a qual é proporcional a intensidade luminosa. A figura 10 mostra o equipamento LED-terapia com o radiômetro desenvolvido.



Figura 10: Fotografia do equipamento LED-terapia e o radiômetro desenvolvido.

A área iluminada vista pelo detector corresponde ao tamanho do orifício de entrada do mesmo (2 cm de diâmetro). As medidas também foram espaçadas de 10 em 10 cm até a distância máxima de 40 cm da fonte luminosa. A figura 11 mostra como foi realizado o mapeamento da distribuição espacial da luz nos diferentes planos paralelos.



Figura 11: Mapeamento da distribuição espacial da luz em diferentes planos paralelos

3.1.2 Equipamento Convencional Fluorescente

Foi utilizado para a comparação um equipamento de fototerapia Convencional Fluorescente (Hospital Pró-Infância- São José dos Campos), com características: Modelo Convencional, fabricado pela FANEM, com 2 lâmpadas Fluorescentes 20W na cor azul e 3 lâmpadas fluorescentes 20W “luz do dia”.

Para a comparação da fototerapia Convencional Fluorescente e LED-terapia, foram feitas medições da irradiância emitida utilizando o Espectroradiômetro USB 2000 da Ocean Optics Inc. (USA), pertencente ao INPE, com sensibilidade entre 339 nm e 1019 nm. A distância entre as fontes luminosas (LEDs e lâmpadas fluorescentes) e o detector (posicionado no centro das regiões iluminadas), foi de 10 cm para o LED-terapia, e 45 cm para a fototerapia Convencional Fluorescente.

3.2 Animais

Para o desenvolvimento deste estudo foram empregados 30 ratos Wistar machos (aproximadamente 500g), provenientes do biotério Anilab (Animais de Laboratório, Campinas-SP), mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas e água e ração *ad libitum*. Neste estudo os animais foram tratados segundo o princípio ético da experimentação animal de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com aprovação do “Comitê de ética em pesquisa animal” da UNIVAP, protocolo nº A054/CEP/2007.

3.3 Grupos experimentais

Foram usados 30 ratos, divididos aleatoriamente em três grupos de 10 animais e subdivididos em dois grupos, sendo $n=5$.

- Grupo A: controle, (negativo), sem cirurgia;
- Grupo B: controle (positivo), com cirurgia de LDBC. Tanto o grupo A quanto o B foram avaliados após 7 dias;
- Grupo C: LED, os animais foram expostos ao LED-terapia por um período de 8 horas;
- Grupo D: LED, os animais foram expostos ao LED-terapia por um período de 24 horas;
- Grupo E: Fluorescente (FLUO.), os animais foram expostos à fototerapia Convencional Fluorescentes por um período de 8 horas;

- Grupo F: Fluorescente (FLUO.), os animais foram expostos à fototerapia Convencional Fluorescentes por um período de 24 horas.

Todas as terapias foram realizadas a partir do sétimo dia da indução LDBC.

De acordo com dados acima prescritos, a tabela 3 indica a divisão da experimentação animal.

Tabela 3: Indicação dos grupos experimentais

| <u>GRUPO EXPERIMENTAL (n=30)</u> | | | | | |
|----------------------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|
| Grupo Controle (n=10) | | Grupo LED (n=10) | | Grupo FLUO. (n=10) | |
| Positivo (A) (n=5) | Negativo (B) (n=5) | LED 8h (C) (n=5) | LED 24h (D) (n=5) | FLUO. 8h (E) (n=5) | FLUO. 24h (F) (n=5) |

FLUO = Fototerapia Convencional Fluorescente

Positivo = Animais normais sem cirurgia

Negativo = Animais com Ligadura do Ducto Biliar Comum (LDBC) e avaliados após sete dias

LED 8h = Animais com 7 dias de LDBC + 8 horas de tratamento com o LED-terapia e avaliados

LED 24h = Animais com 7 dias de LDBC + 24 horas de tratamento com LED-terapia e avaliados

FLUO. 8h = Animais com 7 dias de LDBC + 8 horas de tratamento com fototerapia Convencional Fluorescente e avaliados

FLUO. 24h = Animais com 7 dias de LDBC + 24 horas de tratamento com fototerapia Convencional Fluorescente e avaliados

3.3.1 Indução da Hiperbilirrubinemia: Procedimento Cirúrgico de Obstrução do Ducto Biliar Comum

Para indução de hiperbilirrubinemia os animais receberam administração de 0,1 mL para cada 100 g de peso corpóreo de Cloridrato de cetamina 10% (Syntec) e Cloridrato de xilazina 2% (Syntec), via intramuscular^(30,31). Após assepsia com álcool iodado 2% na região da incisão a cirurgia foi realizada por meio de laparotomia mediana (incisão mediana=1,5cm). Identificado o ducto biliar foi feita ligadura com fio de sutura inabsorvível monofilamentar de polipropileno 6-0. A parede abdominal foi fechada com sutura simples em dois planos, utilizando-se fio de polipropileno 4-0. Este modelo experimental foi realizado de acordo com Gibelli em 2003⁽³²⁾.

3.3.2 Intervenção terapêutica experimental

Para a realização do procedimento terapêutico, os animais permaneceram em gaiolas e os equipamentos foram posicionados acima das mesmas, em diferentes distâncias, LED-terapia a 10 cm e fototerapia Convencional Fluorescente a 45 cm, por motivos da Norma IEC⁽⁵⁵⁾.

O tratamento nos grupos LED e FLUO tiveram início 7 dias após finalização do procedimento cirúrgico de LDBC (PO-Pós operação). Após o tratamento foi instituído o exame sanguíneo de bilirrubina.

Nas figuras 12A, 12B e 12C são mostradas fotografias de exposição dos animais com o LED-terapia.

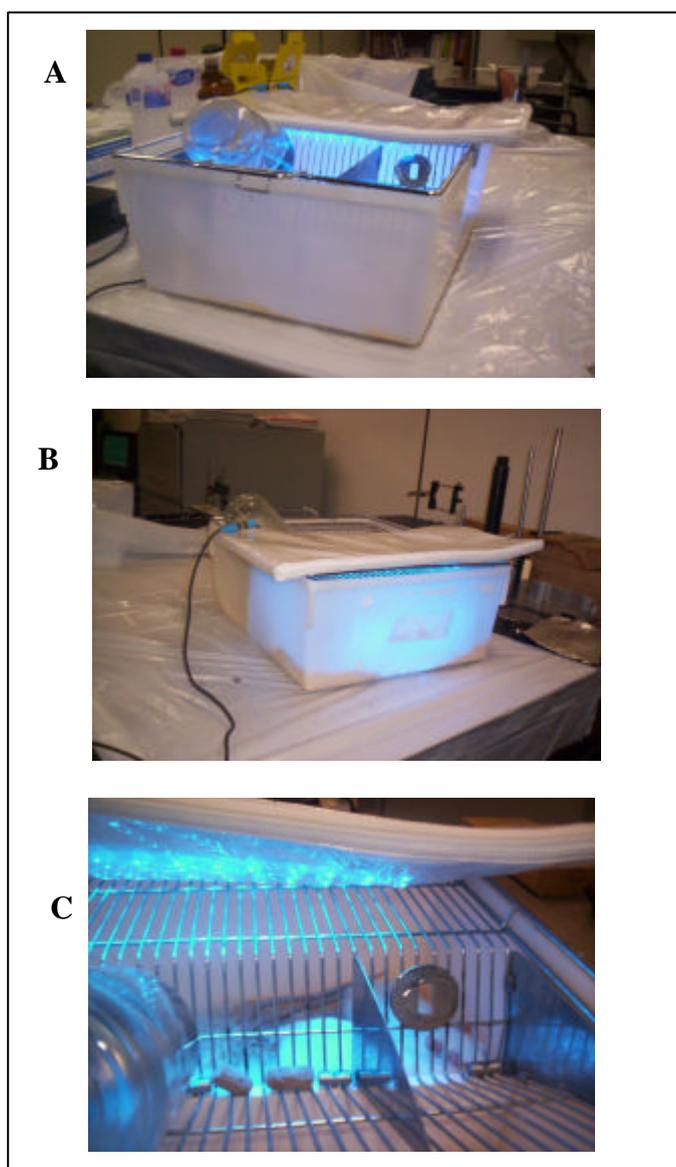


Figura 12: Aplicação do LED-terapia nos animais com hiperbilirrubinemia. Vista do equipamento frontal (A), lateral (B) e em detalhe (C).

Seguindo a parte experimental, nas figuras 13A e 13B são mostradas fotografias da exposição dos animais à fototerapia Convencional Fluorescente.

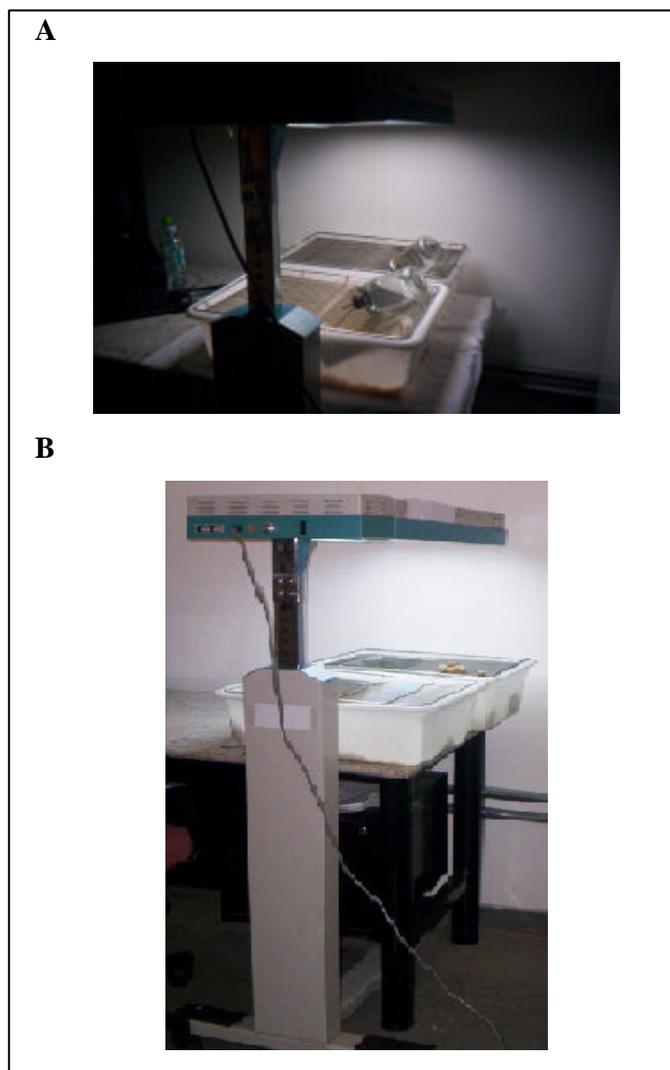


Figura 13: Aplicação da fototerapia Convencional Fluorescente nos animais com hiperbilirrubinemia. Vista superior (A) e lateral (B) do equipamento.

3.3.3 Coleta e análise da bilirrubina

Foi coletado 1 mL de sangue de cada animal por via cava inferior e centrifugada para a separação do soro sanguíneo, em centrífuga Macro III.

A bilirrubina foi dosada por diazotização e formação de azobilirrubina vermelha com absorção máxima em 525 nm. A bilirrubina direta foi dosada em meio aquoso, enquanto que a total (direta e indireta) foi dosada por ação de um solubilizador de ação catalisadora. Para o

procedimento de preparo manual (reações químicas), foram utilizados três tubos de ensaio grandes e um pequeno para o Diazo Reativo, procedendo a seguir:

Preparo do Diazo reativo (tubo de ensaio pequeno): é um processo químico na qual se mistura uma gota do reativo Nitrito de Sódio e 1,5 mL do reativo Ácido Sulfanílico.

Preparo dos tubos de ensaio grandes: Os tubos são chamados de B (branco), D (direta), T (total). Para o tubo B, 2,5 mL de água deionizada, 0,2 mL do reativo Sulfanílico e 0,05 mL de soro da amostra sanguínea. Para o tubo D, 2,5 mL de água deionizada, 0,2 mL do Diazo reativo e 0,05 mL de soro da amostra. Para o tubo T, 2,5 mL de revelador, 0,2 mL de Diazo reativo e 0,05 mL de soro da amostra.

Após 5 minutos as reações foram analisadas por um Espectrofotômetro (Intertek, Stat Fax 3300) a 530nm, como é mostrado na figura 14 ⁽⁵⁶⁾.



Figura 14: Espectrofotômetro Intertek

Os valores foram lidos separadamente e somente a bilirrubina direta e a total foram identificadas. A bilirrubina indireta (BI) foi obtida pela diferença das bilirrubinas total (BT) e direta (BD), $BI=BT-BD$ ⁽⁵⁶⁾.

3.4 Análise estatística

Os resultados foram armazenados e processados com o programa Microsoft Office (Excel como forma de cálculo). Os valores dos dados obtidos foram expressos em média \pm erro da média. Os cálculos estatísticos foram feitos com o programa GraphPad InStat Versão 3.0. Foi utilizado o teste t-Student paramétrico e as diferenças estatísticas consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3.5 Eutanásia dos animais

Após o tempo determinado de cada protocolo, os animais foram sacrificados. Feita anestesia, de acordo com o item 3.3.1, foi retirado o sangue pela veia cava inferior para a realização de exames, e posteriormente os animais receberam overdose de cloreto de potássio 19,1% (Equiplex), via intracardíaca.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do equipamento LED-terapia e a comparação com a fototerapia Convencional Fluorescente

Existem diversos tipos de luz para fototerapia a serem utilizados, porém com seus prós e contras. As lâmpadas fluorescentes, por exemplo, iluminam grande superfície corporal do RN, mas contém baixa irradiância, média de $3,5 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$, tendo que ser mantida a uma distância na média de 45cm por causa da alta temperatura. As lâmpada halógenas possuem uma ótima irradiância, $25,0 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$, porém são muito utilizadas em RN pequenos, pois fornecem somente no centro um halo luminoso de 20cm de diâmetro com alta irradiância ⁽¹⁵⁾.

O equipamento LED-terapia possui de acordo com a figura 15, a 10cm de altura, um resultado de $77,0 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$, e a 40cm um máximo de $23,4 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$, obtendo-se uma redução de 70% de uma distância para outra.

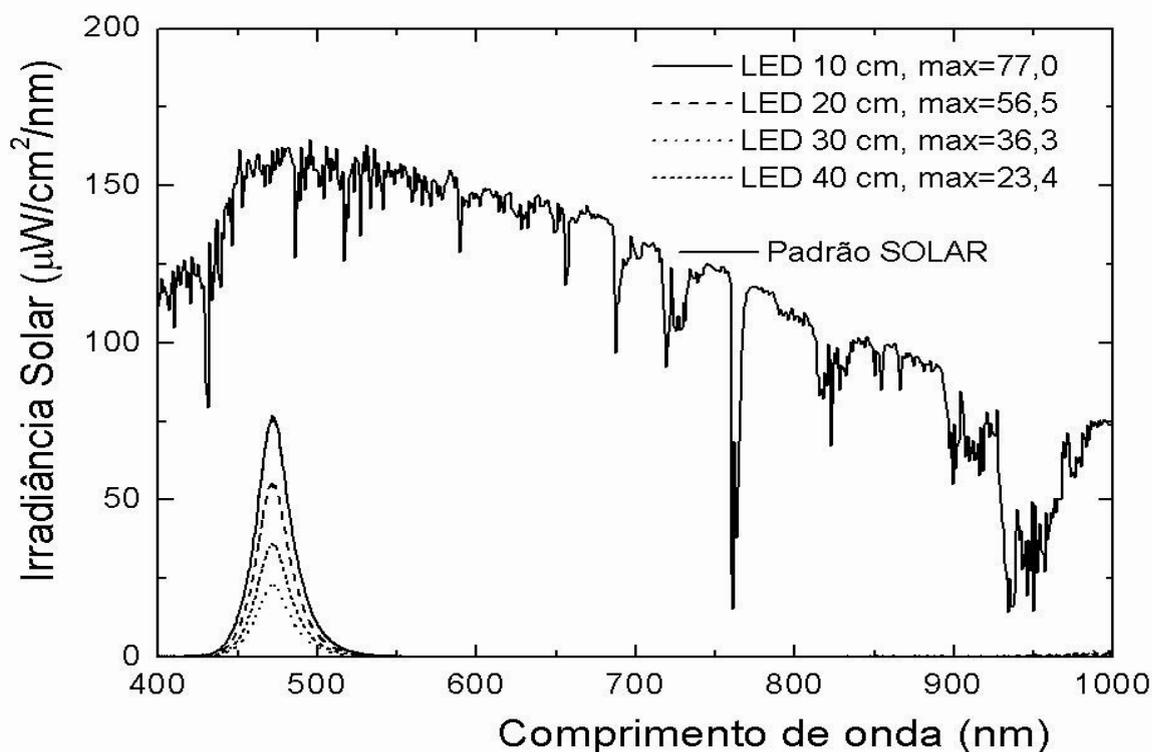


Figura 15: Distribuição espectral da irradiância emitida pela fonte luminosa para diferentes distâncias do equipamento LED-terapia.

A figura 16 mostra a irradiância espectral da radiação emitida pelos equipamentos LED-terapia e Convencional Fluorescente, em função do comprimento de onda a uma distância de 45 cm para ambos. A emissão do LED-terapia apresenta um máximo estreito, com uma largura de 50 nm, entanto que para o Convencional Fluorescente o espectro é largo cobrindo a faixa espectral de 350 a 700 nm. Na figura pode-se observar que o máximo de irradiância para o LED-terapia é 3 vezes maior que para o Convencional Fluorescente.

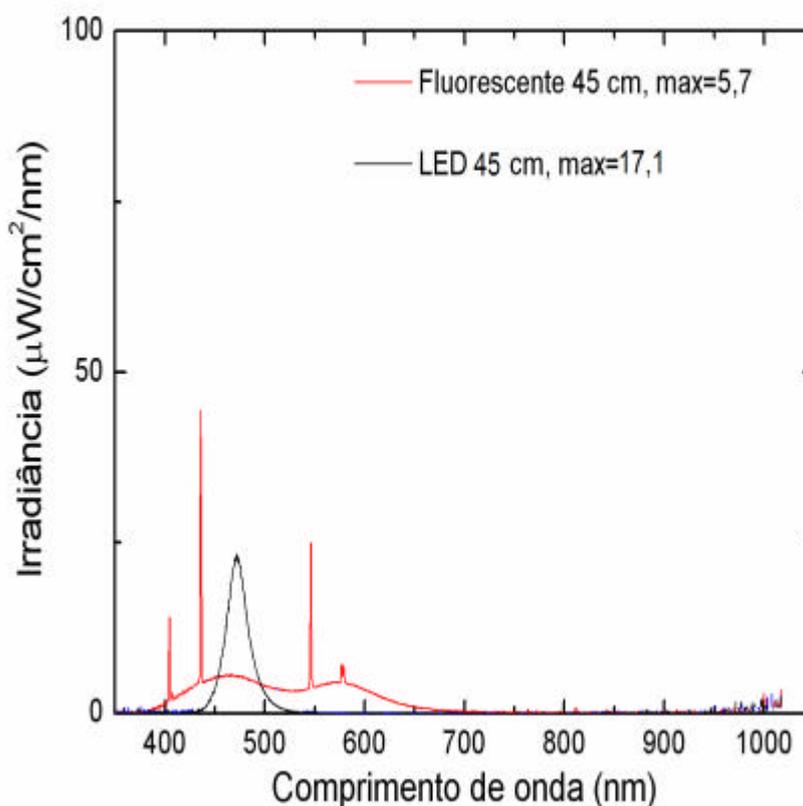


Figura 16: Irradiância espectral dos equipamentos de LED-terapia e fototerapia Convencional Fluorescente, em função do comprimento de onda, ambos na distância de 45 cm.

A distribuição espacial da radiação do sistema óptico, a 10 cm de altura, é mostrada na figura 17. Observa-se que a irradiância é máxima no centro do equipamento, com um valor de $1260 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ e, diminui à medida que se afasta do centro. A região pontilhada na figura corresponde à área do cobertor de LEDs. Nesta área temos uma potência de iluminação de $790 \pm 470 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, que corresponde a uma uniformidade de 59%. Na borda do cobertor a irradiância cai para aproximadamente $550 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, que corresponde a 45% do valor máximo. Este valor da irradiância é ainda muito alto em relação aos fornecidos pelos convencionais.

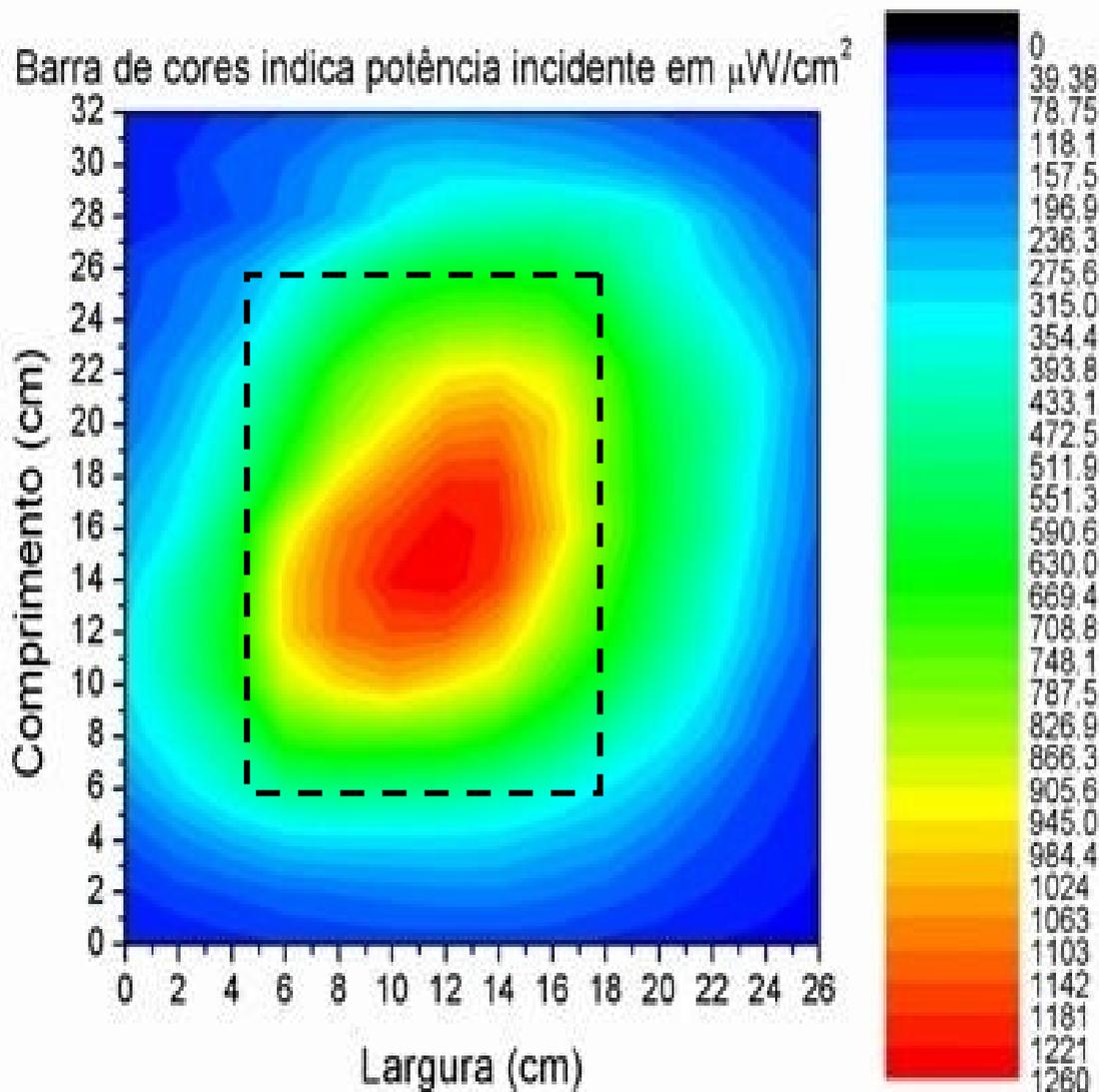


Figura 17: Distribuição espacial da radiação a uma distância de 10 cm

Na figura 18 é mostrada a distribuição espacial da radiação emitida pela fonte de LEDs a uma distância de 30 cm de altura. A irradiância ainda é máxima no centro de equipamento $815,0 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, valor este mais baixo que para uma distância de 10 cm.. Nas bordas da área pontilhada (entre 2 e 21 cm na largura e de 6 a 26 cm no comprimento) a irradiância é reduzida para $356,6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, uma redução a 44% do máximo. Nesta área temos uma potência de iluminação de $585 \pm 230 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, que corresponde a uma uniformidade de 39%. Uma irradiância de $356,6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ continua sendo ainda muito mais alta que a emitida pelos equipamentos convencionais fluorescentes.

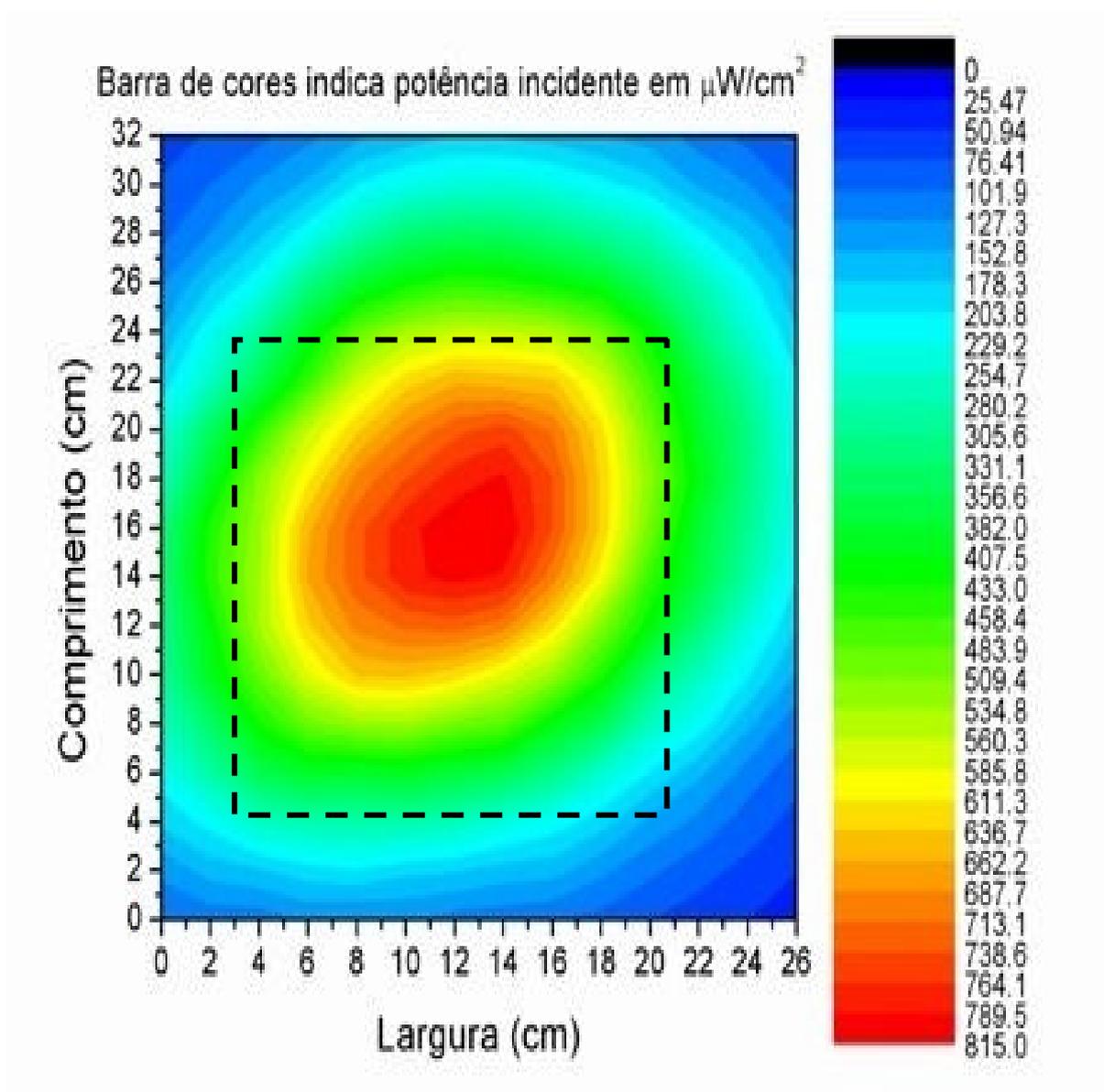


Figura 18: Distribuição espacial da radiação a uma distância de 30 cm.

4.2 Hiperbilirrubinemia Induzida

Os valores de bilirrubina total, direta e indireta estão resumidos na tabela 4.

Tabela 4: Análise dos dados de bilirrubina total, direta e indireta após LED -terapia e fototerapia Convencional Fluorescente. O nível de significância estatística foi estabelecido pela comparação entre o grupo LED-terapia e fototerapia Convencional Fluorescente. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média .

| Bilirrubina | Controle | LDBC | LED | Fluorescente | LED | Fluorescente |
|-----------------|-----------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| | | | 7 dias PO | 8 h PT | 24 h PT | |
| Total | 0,72 \pm 0,14 | 13,18 \pm 1,03 ^a | 9,92 \pm 1,13 ^b | 12,04 \pm 0,95 | 1,36 \pm 0,29 ^{d,g,h} | 9,2 \pm 1,38 ^e |
| Direta | 0,48 \pm 0,08 | 6,12 \pm 1,07 ^a | 8,32 \pm 0,94 | 7,58 \pm 0,78 | 0,80 \pm 0,16 ^{d,g,h} | 7,48 \pm 1,32 |
| Indireta | 0,24 \pm 0,09 | 7,06 \pm 0,57 ^a | 1,60 \pm 0,37 ^{b,f} | 4,46 \pm 0,37 ^c | 0,56 \pm 0,19 ^{d,h,g} | 1,72 \pm 0,29 ^{e,i} |

LDBC – Ligadura do ducto biliar comum, **PO** – Pós-operatório, **PT** – Pós-terapia. ^{a-i} $p < 0,05$ (Intergrupos - **a:** Controle vs LDBC; **b:** LDBC vs LED 8 h PT; **c:** LDBC vs Fluorescente 8 h PT; **d:** LDBC vs LED 24 h PT; **e:** LDBC vs Fluorescente 24 h PT; **f:** LED 8 h PT vs Fluorescente 8 h PT, **g:** LED 24 h PT vs Fluorescente 24 h PT, Intragrupos – **h:** LED 8 h PT vs LED 24 h PT; **i:** Fluorescente 8 h PT vs Fluorescente 24 h PT).

A figura 19 mostra a diferença dos animais após feita cirurgia de LDBC. A partir das primeiras 24 h de LDBC pode-se observar uma coloração corpórea amarelada.

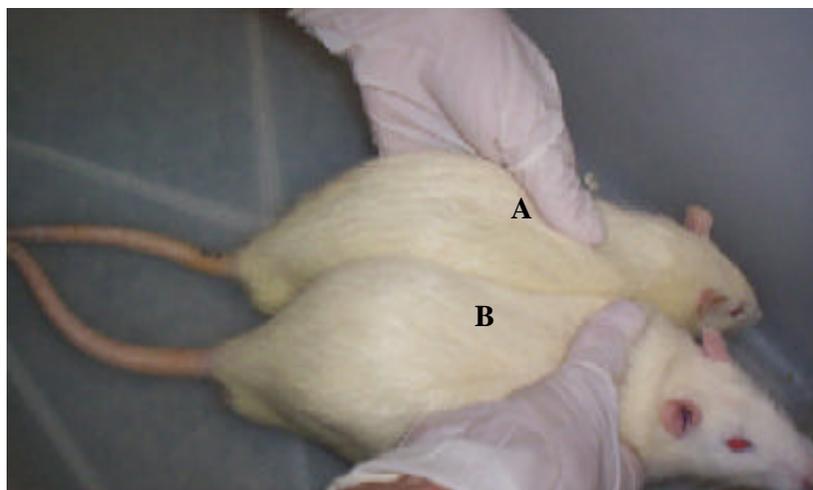
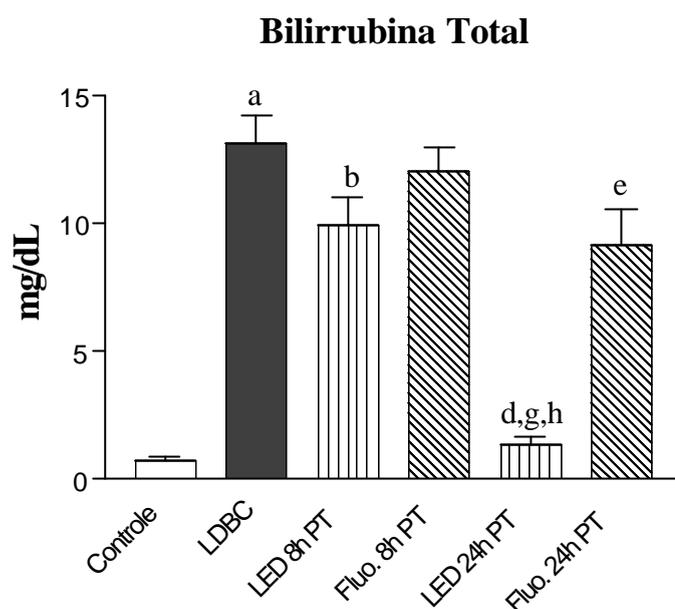


Figura 19: A) animal icterico, B) animal normal

De acordo com os resultados mostrados na figura 20, observa-se que a cirurgia de LDBC foi extremamente eficiente nos animais normais ($p < 0,001$), tendo um significativo aumento da bilirrubina total, atingindo uma média de 13,18 mg/dL.

Observa-se que o grupo de animais com LDBC, tratados 8 horas com a fototerapia Convencional Fluorescente não foi significante relacionando-se com o grupo LDBC sem o tratamento, sendo assim descartada a possibilidade de utilização do equipamento fototerápico Convencional Fluorescente por ser ineficaz para tratamentos de curta duração.



Legenda:

a (Controle vs LDBC)= $p < 0,001$, extremamente significante

b (LDBC vs LED 8h PT)= $p < 0,05$, significante

d (LDBC vs LED 24h PT)= $p < 0,001$, extremamente significante

e (LDBC vs Fluo. 24h PT)= $p < 0,05$, significante

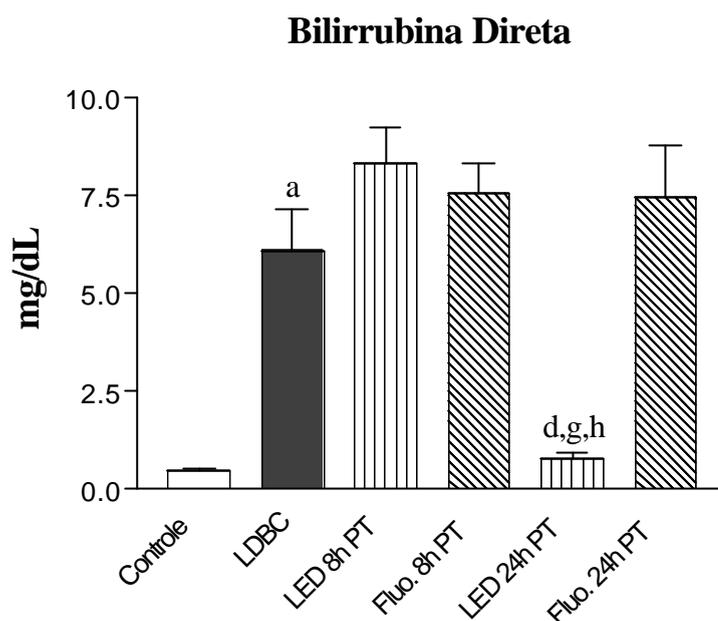
g (LED 24h PT vs Fluo. 24h PT)= $p < 0,001$, extremamente significante

h (LED 8h PT vs LED 24h PT)= $p < 0,001$, extremamente significante

Figura 20: Concentração de bilirrubina total nos diferentes grupos experimentais.

A figura 21 apresenta a concentração de bilirrubina direta nos grupos experimentais. A bilirrubina direta nos animais com poucas horas de tratamento fototerápico (LED 8h e Fluo. 8h) e fototerapia Convencional Fluorescente com 24 horas de tratamento, não foram significantes relacionando-se com o grupo de LDBC sem o tratamento. Porém o grupo tratado com 24 horas de LED-terapia foi muito significativo ($p < 0,01$) quando comparado com todos os outros grupos.

A bilirrubina direta do grupo tratado com 24 horas reduziu significativamente ($p < 0,001$) após LED-terapia. O valor da bilirrubina direta do grupo LED-terapia foi 89,4% menor que o valor obtido após a fototerapia Convencional Fluorescente (grupo tratado com 24 horas).



Legenda:

a (Controle vs LDBC)= $p < 0,001$, extremamente significativa

d (LDBC vs LED 24h PT)= $p < 0,01$, muito significativa

g (LED 24h X Fluo. 24h)= $p < 0,01$, muito significativa

h (LED 8h PT vs LED 24h PT)= $p < 0,001$, extremamente significativa

Figura21: Concentração de bilirrubina direta nos diferentes grupos experimentais .

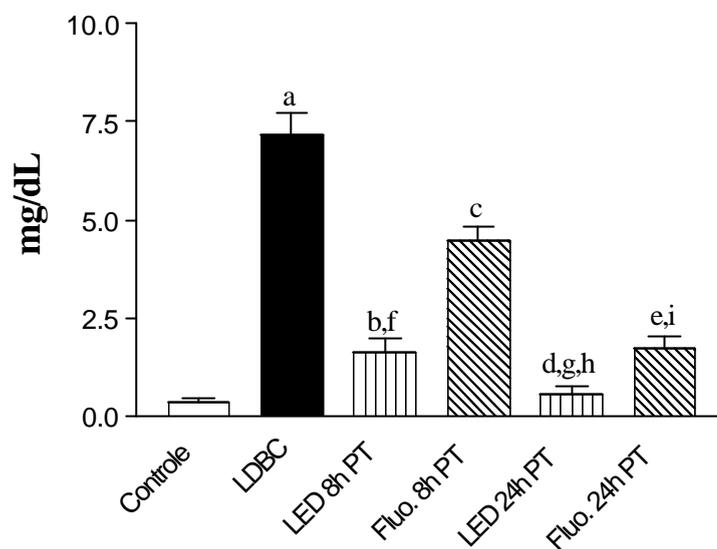
Na figura 22 está expressa a bilirrubina indireta, mostrando a extrema significância ($p < 0,001$) nos grupos Controle e LDBC em 95,6%. Após tratamento fototerápico, tanto com o LED-terapia como a fototerapia Convencional Fluorescente, a bilirrubina indireta teve uma queda extremamente significativa ($p < 0,001$), relacionando-se ao grupo com LDBC.

Comparando o LED-terapia e a Convencional Fluorescente, em 8 horas de tratamento pode-se observar a extrema significância ($p < 0,001$) em 64,2% de eficácia do LED-terapia para a quebra da molécula de bilirrubina indireta. Em 24 horas de tratamento temos uma redução em 67,5% ($p < 0,05$).

O grupo tratado 8 horas com LED-terapia foi extremamente significativa ($p < 0,001$), com 77,8% de redução nos valores de bilirrubina, sendo que com o grupo tratado 8 horas com a fototerapia Convencional Fluorescente foi somente 38% efetivo na redução dos valores de bilirrubina indireta, em relação aos animais do grupo LDBC.

O grupo tratado 24 horas com LED-terapia foi extremamente significativo ($p < 0,001$), com 92,2%, sendo que com o grupo tratado 24 horas com a fototerapia Convencional Fluorescente foi 76,1% efetivo, em relação aos animais do grupo LDBC.

Bilirrubina Indireta



Legenda:

- a (Controle vs LDBC)= $p < 0,001$, extremamente significativa
- b (LDBC vs LED 8h PT)= $p < 0,001$, extremamente significativa
- c (LDBC vs Fluo. 8h PT)= $p < 0,001$, extremamente significativa
- d (LDBC vs LED 24h PT)= $p < 0,001$, extremamente significativa
- e (LDBC vs Fluo. 24h PT)= $p < 0,001$, extremamente significativa
- f (LED 8h PT vs LED 24h PT)= $p < 0,05$, significativa
- g (Fluo. 8h PT vs Fluo. 24h PT)= $p < 0,001$, extremamente significativa
- h (LED 8h PT vs Fluo. 8h PT)= $p < 0,001$, extremamente significativa
- i (LED 24h PT vs Fluo. 24h PT)= $p < 0,05$, significativa

Figura 22: Concentração de bilirrubina indireta nos diferentes grupos experimentais.

5 DISCUSSÃO

A eficácia dos aparelhos de fototerapia depende da concentração sérica inicial da bilirrubina antes do tratamento, superfície corporal exposta à luz, distância entre a fonte luminosa e o paciente, dose e irradiância emitidas e tipo de luz utilizada^(3,4,6,15,16). Assim, a presente pesquisa propõe o estudo da eficácia do LED-terapia⁽³⁵⁾ para o tratamento de hiperbilirrubinemia após LDBC em ratos Wistar. Com objetivos específicos de caracterização do sistema LED-terapia, comparação de características do LED-terapia com a fototerapia Convencional Fluorescente, e a análise da bilirrubina total, direta e indireta.

De acordo com Silva em 2002⁽⁴⁰⁾ alguns parâmetros de análise são de suma importância para a validação de equipamentos de fototerapia. Os ensaios no atual estudo foram contemplados com 2 tipos de experimentos: medição da distribuição espectral de energia (luz) emitida pelos equipamentos, LED-terapia e fototerapia Convencional Fluorescente e medição da distribuição da irradiância num plano de projeção, para o equipamento LED-terapia^(15,16,19,20).

Existem diversos tipos de fototerapia sendo utilizadas, porém com muitos parâmetros a serem definidos. A lâmpada fluorescente, do aparelho convencional, ilumina grande superfície corporal do RN, mas com baixa intensidade de irradiação (3,0-4,0 $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$), com um espectro de emissão amplo (380nm-770nm) devendo ser mantida a uma distância média de 45 cm do paciente, sob o risco de causar hiperaquecimento. Existem estudos evidenciando a possibilidade de aumento da irradiância de 4 $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$ para 12 $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$ quando a lâmpada fluorescente é posicionada de 50 cm para 10 cm do RN, contudo o risco de hiperaquecimento do RN é eminente^(3,7,42-44). Os parâmetros empregados em terapias convencionais promovem a redução da hiperbilirrubinemia, contudo são relativamente longos (com duração de dias no “banho de luz”) e pode causar danos ao RN. Existe ainda a necessidade de emprego de vendas oculares no indivíduo tratado.

No presente estudo o equipamento de LED-terapia a 40 cm gerou uma irradiância de 23,40 $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$, contudo ao reduzir-se esta distância a 10 cm obteve-se uma irradiância de 77,0 $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$, ou seja, 70% de ganho de uma distância para outra. O equipamento de LED-terapia apresenta 67% mais irradiância que o Convencional Fluorescente, a uma distância de 45 cm entre equipamento e medidor de potência. Considerando-se que a luz LED não gera aumento de temperatura a esta irradiância, optou-se pela distância de 10 cm para o tratamento dos ratos ictericos, buscando otimizar o tempo de tratamento em relação ao tratamento convencional. O equipamento de LED-terapia atende as dificuldades atualmente

descritas por diferentes autores ^(3,7,42-44), no que se refere a possibilidade de iluminar amplas superfícies, além de possibilitar diferentes formas de apresentação (colchões, almofada e jaqueta).

Os LEDs na região espectral do azul, empregados no tratamento de hiperbilirrubinemia, não emitem radiação eletromagnética na região do infravermelho ou ultravioleta como ocorre com equipamento Convencional Fluorescente, evitando risco de danos ao DNA ou perda de fluidos nos RN ⁽²⁶⁾. De acordo com Chang et al. em 2005 ⁽²⁶⁾, além das características mencionadas, os LEDs apresentam inúmeras vantagens não encontradas em aparelhos convencionais como peso leve, tamanho compacto, alta eficácia energética, uso de baterias de baixa voltagem e vida extremamente longa. Estas características fazem dos aparelhos de LED fonte de luz ideal para tratamento de fototerapia durante o transporte ou em casa.

Para a validação e comparação do sistema LED-terapia, foi realizada a indução da hiperbilirrubinemia por procedimento cirúrgico de obstrução do ducto biliar comum em ratos Wistar. A obstrução do ducto biliar comum resulta em um acúmulo de substâncias que normalmente são excretadas pela via biliar. Um dos distúrbios provocados pela icterícia obstrutiva é o acúmulo de substâncias tóxicas (bilirrubina indireta), justamente por aumentar a circulação êntero-hepática com a grande atividade da enzima betaglicuronidase que leva a hidrólise da bilirrubina conjugada, de modo que o pigmento de reação indireta novamente se forme, sendo reabsorvido na mucosa intestinal, retornando à circulação sistêmica, obtendo-se o acúmulo da bilirrubina total ^(3,5,6,14,15,20).

De acordo com alguns autores ^(32,34), foi observado que a partir da LDBC a bilirrubina total aumenta de forma significativa a cada hora. Com base nestes estudos foi escolhido o sétimo dia para realização do tratamento fototerápico. Os resultados obtidos nesta pesquisa são semelhantes com os obtidos por Maia et al em 2003 ⁽³²⁾ e Gibelli em 2003 ⁽³⁴⁾, comprovando a hiperbilirrubinemia no sétimo dia. No grupo controle positivo a bilirrubina total (direta e indireta) teve um aumento de 94,5 % com relação ao grupo controle negativo.

No atual estudo foi possível observar que a bilirrubina direta nos animais, com poucas horas de tratamento fototerápico (LED 8h e Fluo. 8h) e fototerapia Convencional Fluorescente com 24 horas de tratamento, não foram significantes relacionando-se com o grupo de LDBC sem o tratamento. Talvez por motivos da realização de uma obstrução ductolar e não uma ruptura das hemácias. Porém observou-se que o grupo tratado com 24 horas de LED-terapia foi muito significativo relacionando-se a todos os outros grupos, sendo

assim o LED-terapia uma possibilidade de cura para outras patologias associadas à bilirrubina direta.

Como relatado na literatura, a icterícia neonatal é o aumento da bilirrubina indireta, por este motivo, foram enfatizados resultados da bilirrubina indireta para validação do equipamento LED-terapia.

Os resultados evidenciaram que a metodologia aplicada para a indução da hiperbilirrubinemia foi eficaz, uma vez que o aumento da bilirrubina total (direta e indireta) após a LDBC foi de 94,5%. A técnica de LDBC empregada ⁽³³⁾ promoveu elevação da bilirrubina total aproximadamente 50% maior que a obtida por Maia et al. em 2003 ⁽³⁴⁾, porém não podemos evidenciar o porquê do aumento, pois o artigo de Maia não especificava técnicas de obtenção da bilirrubina.

Para a realização do tratamento fototerápico nos animais ictericos o equipamento de fototerapia Convencional Fluorescente foi disposto à distância de 45 cm por exigências da norma particular internacional para equipamentos de fototerapia, IEC 60601-2-50 ⁽⁵²⁾. Já o equipamento de LED-terapia foi utilizado a uma distância de 10 cm por gerar alta irradiância sem causar aumento de temperatura.

Segundo Colvero et al. em 2005 ⁽⁷⁾ e Mello em 2006 ⁽⁶⁾ quanto maior: a área exposta, a proximidade (menor distância) e a intensidade luminosa, mais eficaz será o tratamento de fototerapia. Os resultados obtidos no presente estudo (redução da bilirrubina indireta nos grupos tratados durante 8 e 24 horas com LED) atestam propriedade no dado citado.

Segundo Chang et al. em 2005 ⁽²⁶⁾ equipamentos de fototerapia utilizando LEDs causam quebra da molécula de bilirrubina mais rápido que o equipamento Convencional Fluorescente, corroborando os resultados obtidos no presente estudo.

De acordo com resultados, podemos obter vantagens clínicas do uso do LED-terapia como do tempo de tratamento e melhoraria no prognóstico da hiperbilirrubinemia neonatal, reduzindo a necessidade de transfusões sanguíneas, minimizando o risco de bilirrubinas tóxicas no sistema neurológico e efeitos colaterais atestados por Chang et al. em 2005 ⁽²⁶⁾.

Equipamentos com LEDs podem fornecer irradiações muito mais altas, assim como uma maior eficácia, podendo ser considerados fontes ideais de luz para fototerapia para tratamentos em RN ictericos ⁽²⁴⁻²⁹⁾.

Observando-se todos os resultados, as vantagens e benefícios na utilização do LED-terapia são:

- Os RNs poderão receber o tratamento em suas próprias casas, como também em berçários nos hospitais;
- Não existirá necessidade de interromper o tratamento fototerápico durante a amamentação;
- É um equipamento totalmente flexível, podendo ser acondicionado em incubadoras, berços, etc;
- Seu custo será 50% abaixo do equipamento Convencional Fluorescente;
- Maior vida útil do equipamento;
- Circuito simples de fácil e rápida manutenção;
- Ausência de elevação na temperatura corpórea por irradiação direta.

6 TRABALHOS FUTUROS

Sugerem-se os seguintes trabalhos futuros:

- Comparação do equipamento LED-terapia com outros tipos de fonte luminosa (lâmpadas halógenas, fibras ópticas);
- Realizações de tratamentos entre 8 e 24 horas, com indução de hiperbilirrubinemia em quantidades maiores de animais e com pesos de aproximadamente 250 gramas (ratos jovens);
- Análise da temperatura do equipamento LED-terapia comparado com outros equipamentos.

7 CONCLUSÃO

Na avaliação dos resultados obtidos pode-se concluir que o equipamento LED-terapia apresentou maior eficácia, em modelo animal, na fotodegradação das moléculas de bilirrubina, comparada à fototerapia Convencional Fluorescente, usada comercialmente.

REFERÊNCIAS

- (1) GILMORE, I.; GARVEY, C.J. Investigation of Jaundice. **Medicine**, v. 31, n. 1, p. 13-16, 2006. doi:10.1053/j.mpmed.2006.10.007.
- (2) MARTINELLI A.L.C. Jaundice. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 37, p. 246-252, 2004.
- (3) OLIVEIRA, J.V. **Avaliação técnica dos aparelhos de fototerapia do serviço de neonatologia do Hospital Regional da Asa Sul, Brasília, Distrito Federal**. 2006. 13 f. Monografia (Residência Médica em Pediatria) - Hospital Regional da Asa Sul/SES, Brasília, DF, 2006.
- (4) CARVALHO, M. de; LOPES, J.M.A. Fototerapia nos Hospitais Públicos do Rio de Janeiro. **J. Pediatr.** (Rio de Janeiro), v. 67, p. 157-162, 1991.
- (5) CARVALHO M. de, **Programa de Atualização em Neonatologia: Otimização do Uso da Fototerapia no Período Neonatal: Módulo 1**. Rio de Janeiro: Panamericana Editora, 2003. 122 p.
- (6) MELLO, L.C. de, Hiperbilirrubinemia Indireta. In: MARGOTTO, P. R **Assistência ao Recém Nascido de Risco**, 2. ed. Brasília: Hospital Anchieta Brasília, 2006. p. 490-495.
- (7) COLVERO, A.P.; COLVERO, M.O.; FIORI, R.M. Modulus of Teaching Phototherapy. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 15, n. 2, p. 125-132, 2005.
- (8) MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. 4. ed. Porto Alegre: Editora Missau, 2003. 419 p.
- (9) STEDILE, R. **Porfirias e Icterícia**. 2002. 14 f. Seminário da disciplina de Transtornos metabólicos dos animais domésticos, Ciências Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.
- (10) HALAMEK, L.P.; STEVENSON, D.K. Neonatal jaundice and liver disease. In: FANAROFF, A. A.; MARTIN, R. J. **Neonatal-perinatal medicine: Diseases of the fetus and infant**. 6th ed. St. Louis: Mosby Yearbook, 1997. 1345 p. v. 2.
- (11) FALCÃO, M.C.; DEUTSCH A.D´A. Clinical, laboratorial and therapeutic management of the neonatal jaundice. **Pediatrics**, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 280-287, 1997.

- (12) DEUTSCH, A.D´A. Icterícia neonatal. In: LEONE, C. R.; TRONCHIN, D. M. R. **Assistência Integrada ao Recém-nascido**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 171-179.
- (13) JORGE, S.G. **Hiperbilirrubinemia: Síndromes de Gilbert e Crigler-Najjar**. Disponível em: <<http://www.hepcentro.com.br/gilbert.htm>>. Acesso em: 15 out. 2007.
- (14) STEFFENSRUD, S. Hyperbilirubinemia in Term and Near-Term Infants: Kernicterus on the Rise? **Newborn and Infant Nursing Reviews**, v. 4, n. 4, p. 191-200, 2004.
- (15) SILVA, F.M.D.; IDERILHA, E.T.; NETTO, E.J. Desenvolvimento de um Sistema Óptico para Unidade de Fototerapia Neonatal. In: II CONGRESO LATINOAMERICANO DE INGENIERÍA BIOMÉDICA, 2001, Habana, Cuba.
- (16) NETTO, E.J. **Monitor de Radiação para fototerapia**. 1987. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica e Informática Industrial) – Faculdade de Engenharia Elétrica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1987.
- (17) MAISELS, M.J. Phototherapy. In: MAISELS, M. J., WATCHA, J. F., editors. **Neonatal jaundice**. Amsterdam: Harwood Academic, 2000. p. 177-203.
- (18) CREMER, R.J.; PERRYMAN, P. W.; RICHARD, D. A. Influence of Light on Hiperbilirubinemia of Infants. **Lancet**, v. 1, p. 1094-1101, 1958.
- (19) ENNEVER, J.F. Blue Light, Green Light, White Light, More Light: Treatment of Neonatal Jaundice. **Clinics in Perinatology**, v. 17, p. 467-481, 1990.
- (20) LEMES, R. M. et al. Equipamento para Tratamento de Recém Nascido com Icterícia. In: III LATIN-AMERICAN CONFERENCE ON BIOMEDICAL ENGINEERING. **Anais...** 2004, João Pessoa, PB, p. 801-803.
- (21) DICKEN, P.; GRANT, L.J.; JONES, S. An evaluation of the characteristics and performance of neonatal phototherapy equipment. **Physiol. Means**, v. 21, p. 493-503, 2000.
- (22) ARAÚJO, M.C.K.; CORRADINI, H.B. Aplicação de um Critério para Indicação de Fototerapia em Icterícia Neonatal. **Pediatria**, (São Paulo), v. 7, p. 146-150, 1985.
- (23) NAKAMURA, S.; PEARTON, S.; FASOL, G. **The blue Laser Diode: GaN based light emitters and lasers**. 2. ed. Heidelberg: Springer, 1997. 731 p.

- (24) SEBBE, P.F. et al. Characterization of an Optical Device with an Array of Blue Light Emitting Diodes LEDs for Treatment of Neonatal Jaundice. In: REUNIÃO IBEROAMERICANA DE ÓPTICA-VIRIAO. IX ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE ÓPTICA, LÁSERS Y SUS APLICACIONES. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 2007.
- (25) ROSEN, H. et al. Use of a Light Emitting Diode (LED) Array for Bilirubin Phototransformation. In: ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY SOCIETY, IEEE-EMBS, 27th ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE. **Proceeding...**, 2005, New Brunswick, NJ: IEEE-EMBS, p. 7266-7268.
- (26) CHANG, Y.S. et al. In vitro and in vivo Efficacy of New Blue Light Emitting Diode Phototherapy Compared to Conventional Halogen Quartz Phototherapy for Neonatal Jaundice. **J. Korean Med. Sci.**, v. 20, p. 61-64, 2005.
- (27) VREMAN, H.J. et al. In Vitro efficacy measurements of LED-based phototherapy devices compared to traditional light sources in a model system. In: EASL INTERNATIONAL BILIRUBIN WORKSHOP. **Proceeding...** Trieste, Italy: EASL, 2004. p. 51-56.
- (28) VREMAN H. J. et al. Light-emitting diodes: A novel light for phototherapy. **Pediatr. Res.**, v. 44, p. 804-809, 1998.
- (29) SEIDMAN D.S. et al. A new blue light-emitting phototherapy device: A prospective randomized controlled study. **J. Pediatr.**, v. 136, p. 771-774, 2000.
- (30) SEBBE, P. F.; LEMES, R. M. **Equipamento para Tratamento de Icterícia: Modelo de Utilidade.** Braz.Patent # 003060. São Paulo: INPI, 2003.
- (31) CAMERON, G.R, OAKLEY, C.L Ligation of the common bili duct. **J. Pathol. Bact.**, v. 35, p. 769-798, 1932.
- (32) CHOU, S. T, GIBSON, J.B. A histochemical study of the bili ducts in long term biliary obstruction in the rat. **J. Pathol.**, v. 103, p. 163-175, 1971.
- (33) GIBELLI, N. E. M. **Fibrose portal e periportal na obstrução extra-hepática experimental em ratos jovens e adultos: contribuição para o estudo da atresia das vias biliares.** 2003. 1 disco laser. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

(34) FRANK, B.B. Clinical evaluation of jaundice: a guideline of the patient care committee of the American Gastroenterological Association. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 262, p. 3031-3034, 1989.

(35) MAIA, Eugenio Lincoln Campos et al . Repercussões temporais da ligadura do ducto biliar principal em ratos Wistar. **Acta Cir. Bras.** , São Paulo, v. 18, n. 1, 2003 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502003000100009&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 05 dez. 2007.

(36) PRIVATO, M.B. **Mecanismo para Indução da Tolerância Imunológica após transferência gênica no fígado do rato Gunn**. 2005. 1 disco laser. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

(37) BRITO, M.A.; SILVA, R.F.M.; BRITES, D. Bilirubin toxicity to human erythrocytes: A review. **Clinica Chimica Acta**, v. 374, p. 46-56, 2006.

(38) VIEIRA A.A. et al. O uso da fototerapia em recém-nascidos: avaliação da prática clínica. **Rev. Bras. Saúde Mater. Infant.**, v. 4, n. 4, p. 1-12, 2004.

(39) SEBBE, P.F.; VILLAVERDE, A.G.J.B. A Tecnologia da Fototerapia Neonatal. In: V QUALIVITAE, 5 Congresso de Saúde e Qualidade de Vida do Cone Leste Paulista, 2007, São José dos Campos, SP. **Anais...** São José dos Campos: Univap, 2007. p. 126.

(40) SILVA, F. M. D. de; NETTO, E. J. Avaliação Comparativa entre Equipamentos de Fototerapia para Tratamento de Icterícia Neonatal, In: XVIII BRAZILIAN CONFERENCE ON BIOMEDICAL ENGINEERING. **Anais...** São José dos Campos, SP: Univap, 2002.

(41) TAN, K. L. The Pattern of Bilirubin Response to Phototherapy for Neonatal Hyperbilirubinaemia. **Pediatr. Research**, v. 16, p. 670-674, 1982.

(42) CARVALHO, M. de; LOPES, J.M. Qual o tempo de vida útil de lâmpadas fluorescentes para fototerapia? **J. Pediatr.** (Rio de Janeiro), v. 67, p. 151-156, 1991.

(43) CARVALHO, M. de ; LINS, M.F.; LOPES, J.M.A. Lâmpadas Fluorescentes para Fototerapia. **J. Pediatr.** (Rio de Janeiro), v. 68, p. 203-205, 1992.

(44) CARVALHO, M. de. **Fototerapia: Nem tudo que ilumina trata**. 1990. 133 f. Dissertação (Mestrado em Saúde da Mulher e da Criança) - IFF/FIOCRUZ/MS, Rio de Janeiro, 1990.

(45) HART G.; CAMERON R. The importance of Irradiance and in Neonatal Phototherapy. **Arch. Dis. Child Fetal Neonatal**, v. 90, p. 437-440, 2005.

(46) FERREIRA, H. C. **Atualização Terapêutica: Manual Prático de Diagnóstico e Tratamento**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 1981. 530 p.

(47) CARVALHO, M. de; CACHO, A.; LOPES, J M A. Fototerapia simples versus dupla no tratamento da hiperbilirrubinemia em recém-nascidos de risco. **J. Pediatr.** (Rio de Janeiro) v. 72, p. 151-154, 1996.

(48) CARVALHO, M. de; CARVALHO, D de ; TRZMIELINA, S ; LOPES, J M A.; HANSEN, T W R. Intensified phototherapy using daylight fluorescent lamps. **Acta Pediatr.**, v. 88, p. 768-771, 1999.

(49) CARVALHO, M. de; BHUTANI, V. K. Controvérsias em Icterícia Neonatal. In: MARGOTTO, P. R. **Boletim Informativo Pediátrico**, Brasília, v. 62, n. 50, p. 173, 1999.

(50) Disponível em: <<http://www.engenhariabahia.ig.com.br/diodo%20de%20luz.htm>>. Acesso em: 15 ago. 2006.

(51) DE CARVALHO, M. Recentes Avanços em Fototerapia. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NEONATOLOGIA. **Anais...** Rio de Janeiro: SOPERJ, 1999.

(52) SCHANAIDER, A.; SILVA, P.C. The use of animals in experimental surgery. **Acta Cir. Bras.** v. 19, n. 4, p. 441-447, 2004.

(53) SANKARANKUTTY, A.K. et al. Alterações Imunológicas na Icterícia Obstrutiva. **Medicina** (Ribeirão Preto), v. 30, p. 183-191, 1997.

(54) BIONDO-SIMÕES, M de L.P. O processo de cicatrização na Icterícia Obstrutiva. **Medicina** (Ribeirão Preto), v. 30, p. 192-197, 1997.

(55) ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR IEC 60601-2-50**. Medical electrical Equipment. Part 2-50: Particular requirements for the safety of infant phototherapy equipment. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

(56) LABORLAB produtos para laboratório LTDA. **Método Colorimétrico: Bilirrubinas CAT n°00700 Somente para uso in vitro**. São Paulo: Laborlab. Versão 2001/2002. Disponível em: <<http://www.laborlab.com.br/new2.htm>>. Acesso em: 15 ago. 2006.

APÊNDICE A

O LED e suas limitações

Descrição do LED

O LED (*Light Emitting Diode* ou diodo emissor de luz), como o próprio nome já diz, é um diodo (junção P-N) que quando energizado emite radiação luminosa (infravermelha ou visível). A luz é monocromática e é produzida pelas interações energéticas do elétron ⁽²³⁻²⁹⁾. O processo de emissão de luz pela aplicação de uma fonte elétrica de energia é chamado "eletroluminescência" ^(23,50).

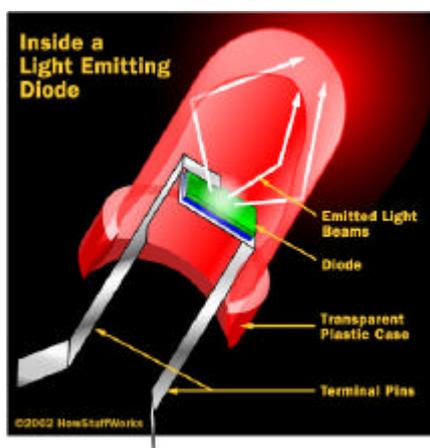


Figura 23: Configuração de um LED.
Fonte: dansdata.com/caselight.htm

O material dopante de uma área do semicondutor contém átomos com um elétron a menos na banda de valência em relação ao material semicondutor. Na ligação, os íons desse material dopante (íons "aceitadores") removem elétrons de valência do semicondutor, deixando "lacunas", portanto, o semicondutor torna-se do tipo P. Na outra área do semicondutor, o material dopante contém átomos com um elétron a mais do que o semicondutor puro em sua faixa de valência. Portanto, na ligação esse elétron fica disponível sob a forma de elétron livre, formando o semicondutor do tipo N ^(23,50).

Na região de contato das duas áreas, elétrons e lacunas se recombinam, criando uma fina camada isenta de portadores de carga, a chamada barreira de potencial, onde temos apenas os íons "doadores" da região N e os íons "aceitadores" da região P, que por não apresentarem portadores de carga "isolam" as demais lacunas do material P dos outros elétrons livres do material N ^(23,50).

Um elétron livre ou uma lacuna só pode atravessar a barreira de potencial mediante a aplicação de energia externa (polarização direta da junção). Aqui é preciso ressaltar um fato

físico do semicondutor: nesses materiais, os elétrons só podem assumir determinados níveis de energia (níveis quânticos), sendo as bandas de valência e de condução as de maiores níveis energéticos para os elétrons ocuparem ^(23,50).

A região compreendida entre o topo da de valência e a parte inferior da condução é a chamada "banda proibida". Se o material semicondutor for puro, não terá elétrons nessa banda (daí ser chamada "proibida"). A recombinação entre elétrons e lacunas, que ocorre depois de vencida a barreira de potencial, pode acontecer na banda de valência ou na proibida. A possibilidade de essa recombinação ocorrer na banda proibida se deve à criação de estados eletrônicos de energia nessa área pela introdução de outras impurezas no material ^(23,50).

Como a recombinação ocorre mais facilmente no nível de energia mais próximo da banda de condução, pode-se escolher adequadamente as impurezas para a confecção dos LEDs, de modo a exibirem bandas adequadas para a emissão da cor de luz desejada (comprimento de onda específico) ^(23,50).

A luz emitida é monocromática (largura de linha estreita, tipicamente na faixa dos 50nm), sendo o comprimento de onda da radiação emitida dependente da composição do cristal e da impureza usada para dopar o componente fabricado. O LED que utiliza o arsenieto de gálio emite radiação infravermelha; entanto que dopando-se com fósforo, a emissão pode ser vermelha ou amarela, de acordo com a concentração. Utilizando-se fosfeto de gálio com dopagem de nitrogênio, a luz emitida pode ser verde ou amarela, etc ^(23,50).

As limitações de um LED

Como o diodo, o LED não pode receber tensão diretamente entre seus terminais, uma vez que a corrente deve ser limitada para que a junção não seja danificada. Assim, o uso de um resistor limitador em série com o LED é comum nos circuitos que o utilizam ^(23,50).

Tipicamente, os LEDs grandes (de aproximadamente 5 mm de diâmetro, quando redondos) trabalham com correntes da ordem de 12 a 20 mA e os pequenos (com aproximadamente 3 mm de diâmetro) operam com a metade desse valor (de 6 a 10 mA) ^(23,50).

Os LEDs não suportam tensão reversa (V_r) de valor significativo, podendo danificar-se com apenas 5V de tensão nesse sentido. Por isso, quando alimentado por tensão C.A.(corrente alternada), o LED costuma ser acompanhado de um diodo retificador em anti-paralelo, com a finalidade de conduzir os semi-ciclos nos quais o LED fica no corte, limitando essa tensão reversa em torno de 0,7V (tensão direta máxima do diodo), ou seja, em um valor suficientemente baixo para que sua junção não se danifique ^(23,50).

ANEXO A

Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º A054/CEP/2007, sobre “*Comparação da eficácia entre a fototerapia utilizando LED’s e a convencional fluorescente para hiperbilirubinemia neonatal.*”, sob a responsabilidade de Priscilla Froés Sebbe, foi **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa por estar de acordo com os Princípios Éticos seguindo as Diretrizes Nacionais e Internacionais da pesquisa envolvendo animais.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 30 de março de 2007



PROF. DR. LUÍS VICENTE FRANCO DE OLIVEIRA
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade do Vale do Paraíba - Univap