

Ação da Terapia Laser de Baixa Potência nos efeitos deletérios histomorfológicos da isquemia em rins destinados a transplante

Rodney Capp Pallota*, Felipe de Moura Messias **, Patrícia Almeida Silva , Rodrigo Labat Marcos**, Lúcio Frigo ***, Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins, PhD**

* Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo – São Paulo – SP – Brasil

**Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde – Universidade Nove de Julho

*** Universidade de Mogi das Cruzes – Mogi das Cruzes - Brasil
email: ralopesmartins@gmail.com

Abstract: Acute Kidney injury (AKI) is associated with a high degree of morbidity and mortality. Ischaemia-reperfusion injury (IRI) is one of the major causes of AKI. Currently, inflammatory cytokines specially TNF- α , seems to be involved in the injury and no pharmacological agents have proven to prevent AKI after IRI. In the last decade we demonstrated that LLLT is able to inhibit several inflammatory markers. Aims. Here we investigate the effect of LLLT on histomorphological parameters in Rat kidney after prolonged ischemia. After approval of the Ethical Committee for Animal Use, Male Wistar rats were taken to the experiment table and anaesthetized with ketamine plus xilazine. The anterior abdominal wall was incised on the median line. Both kidneys were excised and immediately placed in cold nutritive solution. Treated groups received laser therapy with 1,3,6 and 10 Joules of energy in different times. After 2, 12 and 24 hours the kidneys were fixed for histological and biochemical analysis. In the laser treated group, an energy dose of 3 Joules was delivered in two points centrally and bilaterally, 5 min after reperfusion. Histological evaluation was performed. Morphological evaluation demonstrated a better cell organization in the laser-treated groups. **Conclusion.** Our results demonstrated that LLLT was able to preserve the renal tissue from ischemia-induced lesions.

Keywords: LLLT, Laser Therapy, kidney, ischaemia.

Resumo

A lesão renal aguda (LRA) está associada a um grau elevado de morbidez e mortalidade. A Isquemia e reperfusão (IR) é uma das principais causas de LRA. Atualmente, especialmente a citocina inflamatória TNF- α , parece estar envolvida na lesão e não há agentes farmacológicos que comprovadamente possam prevenir a LRA após IR. Na última década, foi demonstrado que a Terapia Laser de Baixa Potência (LLLT) é capaz de inibir diferentes marcadores inflamatórios. Aqui nós investigamos o efeito da LLLT sobre parâmetros histomorfológicos em rim de rato após isquemia prolongada. Após a aprovação do Comitê de Ética para

Uso de Animais, ratos Wistar foram anestesiados com cetamina e xilazina. A parede abdominal anterior foi incisionada na linha mediana. Ambos os rins foram retirados e colocados imediatamente em solução nutritiva gelada. Grupos tratados receberam a terapia a laser com 1,3,6 e 10 Joules de energia em momentos diferentes. Depois de 2, 12 e 24 horas os rins foram fixados para análise histológica. No grupo tratado a laser, uma dose de energia de 3 Joules foi entregue em dois pontos centralmente e, bilateralmente, 5 min após a reperfusão. A avaliação morfológica demonstrou uma melhor organização tecidual nos grupos tratados com laser. Os resultados demonstraram que LLLT foi capaz de preservar o tecido renal de isquemia induzida por lesão.

Introdução

No ano de 2010, a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO) iniciou um grande levantamento dos transplantes realizados no País, com especial atenção às taxas de sobrevidas dos pacientes e dos enxertos. Foram realizados 6.402 transplantes de órgãos, incluindo coração, fígado, intestino, pâncreas, pulmão e rim, no país. Dentre estes, 4.630 transplantes renais, representando um aumento de 8% em relação a 2009[1].

A Doença Renal Crônica (DRC) é, atualmente, considerada um problema de saúde pública mundial e os custos do tratamento da doença são altíssimos. O número projetado atualmente para pacientes em tratamento dialítico e com transplante renal no Brasil está próximo dos 120.000, a um custo de 1,4 bilhão de reais[2]. A Insuficiência Renal Aguda (IRA) é caracterizada por uma redução abrupta da função renal, que se mantém por períodos variáveis, resultando na inabilidade dos rins em exercer suas funções básicas de excreção e manutenção da homeostase hidroeletrólítica do organismo. A IRA se apresenta em diversas formas clínicas, entre elas a IRA isquêmica e a nefrotóxica. Dentre as etiologias de IRA renal, 62% são decorrentes de necrose tubular aguda conseqüentes a causas isquêmicas (72%) e tóxicas (28%) [2,3]. No Brasil, em estudo de Burdmann e cols. (1993), observou-se que as

causas de IRA eram predominantemente: sepse (33%), hipovolemia (33%), insuficiência cardíaca descompensada (32%), nefrotoxicidade de drogas (27%), traumatismo cirúrgico (13%) e hipotensão (20%), com grande ocorrência de associação de dois ou mais desses fatores, e, de forma geral, a maior parte incorrendo em hipoperfusão renal[3].

O mecanismo de isquemia-reperusão é a etiologia mais comumente relacionada à lesão renal [4].

O transplante renal é uma abordagem terapêutica aceitável para pacientes com doença renal terminal. A denominada lesão de isquemia e reperusão (LIR) é um problema clínico, que ocorre como uma consequência invariável dos transplantes, especialmente renal [4]. Existem poucas abordagens terapêuticas efetivas capazes de minimizar a lesão de isquemia e reperusão renal. Recentemente, tem se sugerido que o período pós-isquemia, que é definido como uma rápida interrupção intermitente do fluxo sanguíneo na fase inicial da reperusão protege o coração contra as lesões de isquemia e reperusão. Esta proteção também foi observada para o rim. Em transplantes renais, a ocorrência de lesões por isquemia e reperusão renal pode afetar consideravelmente as funções do órgão, colocando em risco o sucesso de todo o processo de transplante. LIR pode ser causada por múltiplos fatores envolvendo células operatórias tubulares, formação de radicais livres de oxigênio, disfunção mitocondrial, geração de citocinas inflamatórias e infiltração de neutrófilos. Dados experimentais em modelos animais de isquemia e reperusão renal demonstram intensa reação inflamatória após um período de isquemia renal de 45 minutos e reperusão de 2 horas [4,11].

Laser de baixa intensidade (LLLT) tem sido utilizado clinicamente desde 1981 no tratamento de pacientes com doenças inflamatórias. As vantagens terapêuticas do LLLT para doenças inflamatórias tem sido sugeridas por vários autores e é apontado como uma alternativa para reduzir a dor. Interessantemente, diversos trabalhos de nosso grupo demonstram a capacidade desta terapia em inibir os principais mediadores inflamatórios envolvidos na LIR renal, a saber, TNF-alfa e COX-2 e aumentar a expressão de outros mediadores antiinflamatórios como IL-10[5,6,7]. O laser pode ainda reduzir a expressão de determinadas colagenases (MMPs) e conseqüentemente reduzir a degeneração do tecido, favorecendo a proliferação celular. No entanto, é muito importante ressaltar que muito pouco se conhece a respeito do mecanismo de ação do laser infravermelho em órgãos internos e nobres como o Rim, especialmente em condições de isquemia e transplante. Tendo em vista a experiência prévia do grupo de pesquisa, no estudo dos mecanismos de ação do Laser de baixa potência em diferentes doenças ou situações inflamatórias, visamos investigar os efeitos da laserterapia na lesão por isquemia e reperusão em rins destinados ao transplante.

Material e Métodos

Foram utilizados 45 ratos Wistar machos pesando entre

150 e 200g (+/- 60 dias de vida), com livre acesso a água e ração. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas. O presente protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Nove de Julho (AN 0018/2011).

Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina 10% (0,2 ml/100 gramas do animal) e de xylazina 2% (0,1 ml/100 gramas do animal), e submetidos à cirurgia bilateral para extração dos rins. Os rins extraídos foram imediatamente acondicionados em solução comercial para manutenção de órgãos destinados a transplante, conforme especificações da Rede Brasileira de Transplantes (RBT). Após a cirurgia os animais foram sacrificados por administração de superdose de anestésico. Após a cirurgia de extração renal, os órgãos mantidos em solução específica para manutenção de órgãos para transplante foram irradiados com Laser de baixa potência (810 nm e 100 mW de potência; 0,028 cm² de área de feixe; Thera Lase, DMC®) em diferentes tempos (2, 12 e 24 horas) durante 10, 30, 60 e 100s caracterizando as doses de energia/ponto de 1, 3, 6 e 10 Joules. As irradiações foram realizadas em 2 pontos de cada hemisfério renal, iniciando-se em diferentes momentos (vide protocolos a seguir).

Processamento histológico

Os espécimes (rins) foram delimitados em metade ventral e dorsal, e processados para análise histológica. Cortes histológicos de cinco micrômetros de espessura foram realizados em micrótomo rotativo (RM2125 RT, Leica Instruments, USA) acoplado com navalha descartável. Foram selecionados três cortes histológicos em sequência (um para coloração HE, outro para coloração picrossírius e outro reserva), os quais foram transferidos para o banho histológico (Easybath, Easypath, SP, Brasil). Estes cortes histológicos foram coletados em lâminas de vidro revestidas com poli-lisina (Sigma, USA). Para a coleta das imagens digitais foi utilizado um microscópio de luz (DM500, Leica, CA, USA) com objetiva de 4x, acoplado com uma câmera digital (Sony, CA, USA) com programa para captura de imagens (Qwin, Leica, USA). As imagens digitais foram gravadas em formato TIFF.

Resultados

Análise histopatológica

Os espécimes mostraram adequadas condições de preservação tecidual, sem visíveis artefatos de fixação histológica. A coloração pelo método HE permitiu visualizar as características estruturais dos néfrons e tubos coletores, em particular, a morfologia celular (epitélio renal) e detalhes do perfil nuclear (figura 1). Além disso, o tecido conjuntivo de preenchimento, o sistema vascular renal e possíveis processos inflamatórios foram evidenciados (figura 1).

A coloração pelo método do picrossírius permitiu visualizar o tecido conjuntivo de preenchimento,

restringindo a análise a um dos componentes teciduais (matriz extracelular fibrilar) (figura 1). A análise histopatológica revelou que os espécimes apresentaram dois padrões típicos: a) condições de normalidade tecidual ou, ocasionalmente, com leves alterações celulares que não permitem isoladamente caracterizar uma patologia renal (figura 1); b) alterações histopatológicas, restritas aos glomérulos (glomerulopatia membranosa, figura 1), com intensidades leve ou moderada e/ou associadas à necrose tubular aguda (leve ou moderada) (figura 1). A necrose tubular aguda pode ser decorrente de isquemia (perfusão renal insuficiente). A glomerulopatia membranosa observada apresentava principalmente com grau leve e, ocasionalmente moderado. Estava caracterizada com espessamento do tecido conjuntivo subjacente ao epitélio dos vasos sanguíneos do glomérulo renal, evidenciando pela exuberância da coloração eosinofílica (figura 1). Não foi evidenciado processo inflamatório associado. A necrose tubular aguda estava evidenciada nos túbulos contorcidos distais ou proximais, alças de Henle e nos tubos coletores. As alterações mais pronunciadas foram à presença de células vacuolizadas, com granulações citosólicas difusas e a descamação de células necróticas ou viáveis no lúmen dos túbulos (figura 2). Em alguns casos, o lúmen estava preenchido por material hialino, celular ou granular (figura 2). Não foi evidenciado processo inflamatório associado, indicando que o processo necrótico estava em processo inicial.

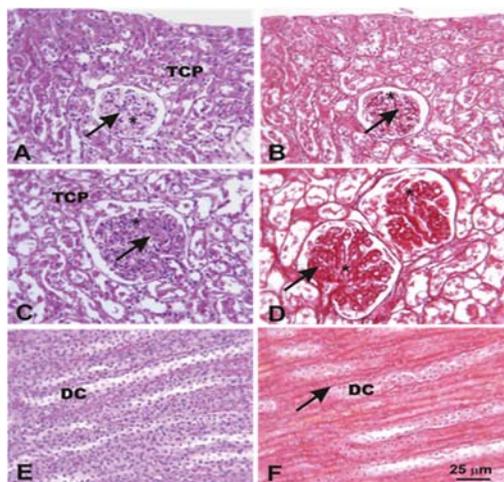


Figura 1. Cortes histológicos de rim mostrando as regiões cortical (A-D) e medular (E-F) coradas pelos métodos do HE (A, C, E) e do picrossírius (B, D, F). Observar em A-B, um corpúsculo renal em condições de normalidade sem espessamento de suas membranas (seta) no glomérulo renal (Grupo - 01 Joule). Observar em C-D um corpúsculo renal com glomerulopatia membranosa leve, evidenciado pelo espessamento das membranas (seta) do glomérulo (Grupo - Controle). Observar em E-F os túbulos coletores em condições de normalidade, assim como o tecido intersticial (seta). Abreviaturas: *, corpúsculo renal; DC, dutos ou túbulos coletores; TCP, túbulo contorcido proximal.

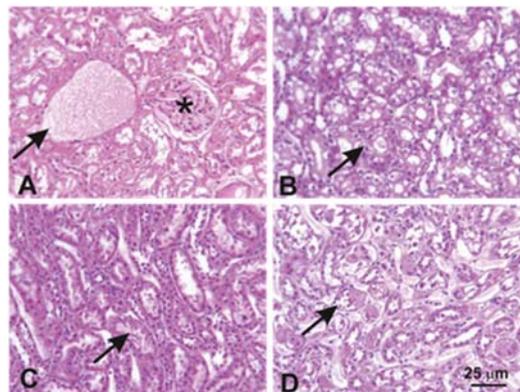


Figura 2. Cortes histológicos de rim mostrando a região medular corados pelo método do HE com diferentes características de necrose tubular aguda. Observar em A uma congestão vascular (seta) (Grupo - Controle). Em B é mostrado cortes transversais de túbulos contorcidos proximais e distais com material granuloso e vacuolização no citosol de células em processo de degeneração (seta) (Grupo - Controle). Em C é mostrado túbulos com material hialino descamado no lúmen (seta) (Grupo - 03 Joules). Em D é mostrado algumas alça de Henle preenchido com material hialino e células degeneradas (seta) (Grupo - Controle). Abreviaturas: *, corpúsculo renal.

Na Figura 03 podemos observar os cortes histológicos no tempo de 12 horas. No grupo Controle observamos Necrose tubular aguda leve. Presença de células com granulações e vacuolizações. Presença de material hialino no lúmen. No grupo 1,3 e 6 Joules observamos Necrose tubular aguda leve. Presença de células com granulações e vacuolizações. Presença de material hialino no lúmen. No grupo 10 J Necrose tubular aguda leve. Presença de células com granulações e vacuolizações

Discussão

A chamada Isquemia / reperfusão Renal (IRI) tem sido apontada como causa comum de Lesão Renal Aguda (LRA), e resulta de uma deficiência generalizada ou localizada de oxigênio e de nutrientes para entrega, e remoção de produtos do metabolismo a partir de células do rim. Como resultado do desequilíbrio, as células epiteliais tubulares podem sofrer lesões graves ou mesmo morte por apoptose e/ou necrose (necrose tubular aguda [ATN]), com insuficiência de órgãos funcionais e homeostase de eletrólitos e excreção reduzida de resíduos de produtos de metabolismo. Existem muitos estados fisiopatológicos e medicamentos que podem contribuir para a isquemia generalizada ou localizada [4].

O objetivo deste trabalho foi verificar um possível efeito terapêutico do Laser de Baixa Potência sobre as lesões decorrentes do fenômeno de isquemia renal. Sabemos que a radiação laser operando em baixa intensidade apresenta importante atividade antiinflamatória,

visamos investigar tais efeitos no modelo experimental ora estudado. As análises histomorfológicas qualitativas realizadas até o momento revelaram uma proteção dos grupos tratados com Laser, quando comparado ao grupo somente isquemia. Os achados histológicos demonstram claramente o efeito protetor do tratamento com Laser sobre o tecido renal. Podemos observar nos quadros da análise qualitativa, que todas as doses de energia utilizadas foram capazes de melhorar ou preservar o tecido analisado.

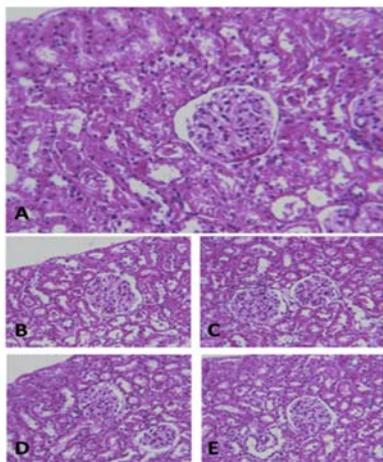


Figura 03 – Cortes histológicas de Rins de ratos corados com HE, onde A – controle; B – 1 Joule; C – 3 Joules; D – 6 Joules e E – 10 Joules, referentes ao protocolo de 12 horas.

Conclusões

A irradiação com Laser de Baixa potência operando em 810 nm e com diferentes doses de energia foi capaz de preservar o tecido renal de lesões induzidas pelos períodos de isquemia de 2, 12 e 24 horas. A análise qualitativa histomorfológica foi capaz de revelar uma proteção conferida pelo tratamento com Laser sobre o dano tecidual induzido pela isquemia e reperfusão renal,

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP pelo apoio financeiro. Grants 2011/18334-1; 2011/18330-1.

Referências

1. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. Registro Brasileiro de Transplantes: http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/populacao/rbt/anoXVI_n4/index.aspx Acesso: 11 de abril. 2011
2. Bastos et al.; Doença Renal Crônica: Frequente e Grave, mas também prevenível e tratável. Ver. Assoc. Med. Bras. V. 56(2), p. 248-53, 2010.
3. Burdman E, et al. Epidemiologia. In: Schor N, Boim MA, Santos OFP. IRA, Insuficiência Renal Aguda: Fisiopatologia, Clínica e Tratamento. J. Bras. Nefrol. v. 24, p. 1-12, 1997.
4. Matsuyama, M.; Yoshimura, R.; Hase, T.; Kawahito, Y.; Sano, H.; Nakatani, T.; Study of cyclooxygenase-2 in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.* v. 37, p. 370-372, 2005.
5. Pallotta, R.C.; Bjordal, J.M.; Frigo, L.; Leal-Junior, E.C.P.; Teixeira, S.; Marcos, R.L.; Ramos, L.; Messias, F.D.M.; Lopes-Martins, R.A.B.; Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers in Medical Science.* v. 77, p. 21-8, 2011.
6. Marcos, R.L.; Leal-Junior, E.C.P.; Messias, F.D.M.; Carvalho, M.H.C.; Pallotta, R.C.; Frigo, L.; Dos Santos, R.A.; Ramos, L.; Teixeira, S.A.; Bjordal, J.M.; Lopes-Martins, R.A.B.; Infrared (810 nm) low-level laser therapy in rat Achilles tendinitis: A consistent alternative to drugs. *Photochem & Photobiol.* v. 87, p. 1447-52, 2011.
7. Lopes-Martins, R.A.B.; Albertini, R.; Leonardo, P.S.L.M.; et al. Steroid-receptor antagonism inhibits the anti-inflammatory effects of low-level laser therapy. *Photomed. Laser Surg.* v. 24, p. 197-201, 2007.
8. Aimbire, F.; Albertini, R.; Pacheco, M.T.; Castro-Faria-Neto, H.C.; Leonardo, P.S.; Iversen, V.V.; Lopes-Martins, R.A.B.; Bjordal, J.M.; Low level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF- α levels in acute inflammation. *Photomed. Laser Surg.* v. 24(1), p. 33-7, 2006
9. Aimbire, F., Bjordal J.M., Iversen V.V.; Low level laser therapy partially restores trachea muscle relaxation response in rats with tumor necrosis factor alpha-mediated smooth airway muscle dysfunction. *Lasers Surg. Med.* v. 38, p. 773–778, 2006.
10. Marcos, R.L.; Leal-Junior, E.C.; Arnold, G.; Magnenet, V.; Rahouadj, R.; Wang, X.; Demeurie, F.; Magdalou, J.; De Carvalho, M.H.; Lopes-Martins, R.A.B.; Low-level laser therapy in collagenase-induced achilles tendinitis in rats: Analyses of biochemical and biomechanical aspects. *Journal of Orthopaedic Research.* v. 30, p. 1945-51, 2012
11. Joensen, J.; Demmink, J.H.; Johnson, M.I.; Iversen, V.; Lopes-Martins, R.A.B.; Bjordal, J.M.; The Thermal Effects of Therapeutic Lasers with 810 and 904 nm Wavelengths on Human Skin. *Photomedicine and Laser Surgery.* v. 29(3), p. 145-153, 2011.
12. Frigo, L.; Fávero, G.M.; Campos-Lima, H.J.; Maria, D.A.; Bjordal, J.M.; Joensen, J.; Iversen, V.; Labat, M.R.; Parizzoto, N.A.; Lopes-Martins, R.A.B.; Low-Level Laser Irradiation (InGaAlP-660 nm) Increases Fibroblast Cell Proliferation and Reduces Cell Death in a Dose-Dependent Manner. *Photomedicine and Laser Surgery.* v. 28(S1) p. S-151-S-156, 2010.
13. Chow, R.T.; Johnson, M.I.; Lopes-Martins, R.A.B.; Bjordal, J.M.; Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo or active-treatment controlled trials. *Lancet* v. 374, p.1897–1908, 2009.