

ASPECTOS HISTOLÓGICOS DO RIM ASSOCIADOS À LESÕES MEDULARES EXPERIMENTAIS TRATADAS COM FOTOBIMODULAÇÃO

Marina Clara Ribeiro dos Santos, Débora Campos Chaves Correia, Leonardo Borges de Lima, Luciana Barros Sant'Anna, Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa.

Universidade do Vale do Paraíba/Faculdade de Ciências da Saúde, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, marinaclara0102@gmail.com.

Resumo

A lesão da medula espinal (LM) é uma das doenças mais devastadoras encontradas na prática clínica neurológica, acarretando significativa disfunção neurológica e no controle autonômico. Não existem protocolos terapêuticos eficazes para LM, e a fotobiomodulação (PBM) tem apresentado efeitos positivos no tratamento de doenças neurológicas. Este estudo objetivou avaliar a aplicação da PBM na fase inicial do processo de reparo tecidual de LM induzida em ratos, com foco na análise histológica dos rins. Utilizou-se 15 ratos (machos, Wistar, *Rattus norvegicus*, 60 dias, 300 ± 20 g) alocados em 3 grupos (n=5/grupo): SHAM (controle, simulação dos procedimentos cirúrgicos), Lesão (indução da LM) e PBM (indução da LM + aplicação PBM), no tempo experimental de 14 dias. Os resultados pioneiros deste estudo demonstraram que a aplicação da PBM reduziu as alterações histológicas no tecido renal, como degeneração e necrose das estruturas na região cortical comparado ao grupo Lesão. Conclui-se que a PBM aplicada na fase inicial do processo de reparo tecidual de LM em ratos, demonstrou redução das alterações histológicas no tecido renal comparadas às detectadas no grupo não tratado.

Palavras-chave: Medula Espinal. Lesão. Reparo. Fotobiomodulação. Rim.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Biomedicina.

Introdução

A lesão da medula espinal (LM) é uma das doenças mais devastadoras encontradas na prática clínica neurológica. Caracterizada como um dano à medula espinhal que acarreta mudanças temporárias ou permanentes em sua função, resultando frequentemente em significativa disfunção neurológica e deficiência. Atualmente, não há protocolos de tratamento eficazes para o reparo da medula espinhal danificada, evidenciando a necessidade de novas abordagens terapêuticas para este cenário desafiador (Ahuja *et al.*, 2017; Baptiste; Fehlings, 2007).

As lesões medulares traumáticas têm impactos profundos nas esferas física, social e profissional dos pacientes e suas famílias, resultando na perda de autonomia e em um aumento persistente na taxa de mortalidade (Ahuja *et al.*, 2017). Estudos revelam que os custos do tratamento de pacientes com lesão medular podem atingir US\$ 1,16 milhões por paciente ao longo da vida, destacando a importância do desenvolvimento de tratamentos eficazes (National Spinal Cord Injury, 2014). Em nível mundial, aproximadamente 2,5 milhões de pessoas vivem com lesão medular traumática, e mais de 130 mil novos casos são reportados anualmente (Hu *et al.*, 2010; Cripps *et al.*, 2011). O impacto econômico da lesão medular traumática no sistema de saúde é significativo, visto que a necessidade de fornecer apoio vitalício, incluindo terapia e reabilitação, torna-se um tema cada vez mais relevante (Baptiste; Fehlings, 2007; Singh *et al.*, 2014).

A mortalidade de pacientes com LME continua elevada, apesar dos avanços nos cuidados médicos. A lesão inicial causa danos primários na medula espinhal. Os danos secundários, decorrentes do processo inflamatório pela agressão tecidual e a consequente liberação de mediadores químicos, induzem a formação de cavidades císticas e cicatrizes gliais, que impedem a regeneração axonal e resultam em déficits neurológicos permanentes (Tator, 1995; Ahuja *et al.*, 2017). As lesões da medula espinhal podem ser traumáticas ou não traumáticas, sendo a LM traumática (LMT) resultante de

impactos físicos externos e a LM não traumática decorrente de doenças como tumores, infecções ou condições degenerativas (Ahuja *et al.*, 2017).

Um aspecto crítico da LM é seu impacto em órgãos vitais, como os rins. A função renal pode ser comprometida após a LM devido a uma série de complicações, resultando em distúrbios no equilíbrio hidroeletrólítico, pressão arterial e na regulação do volume sanguíneo. Além disso, a capacidade de concentração e diluição da urina pode ser afetada, levando a problemas na excreção de resíduos e na manutenção da homeostase. A perda dessas funções renais pode desencadear complicações graves, incluindo infecções urinárias recorrentes, formação de cálculos renais, e insuficiência renal crônica. Essas complicações podem resultar de disfunções autonômicas e alterações na hemodinâmica renal causadas pela LME (Greenwell *et al.*, 2007; Gris *et al.*, 2008; Parvin *et al.*, 2021).

O tratamento cirúrgico atual para estabilização mecânica e descompressão da medula espinhal é uma prática comum, e o uso de medicamentos está sendo extensamente estudado (SOUZA *et al.*, 2013). Nas últimas três décadas, inúmeras terapias neuroprotetoras e neuroregenerativas foram transferidas de estudos pré-clínicos para ensaios clínicos, mas ainda não há uma terapia padrão universalmente aceita. Por isso, a compreensão da cascata fisiopatológica da LM e a realização de pesquisas científicas básicas, utilizando modelos animais clinicamente relevantes, são essenciais para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Ahuja *et al.*, 2017; Baptiste; Fehlings, 2007).

A fotobiomodulação (PBM), utilizando laser de baixa intensidade (LBI), tem sido aplicada no tratamento de várias doenças neurológicas, incluindo acidente vascular cerebral, doenças neurodegenerativas, lesão cerebral e lesões do sistema nervoso periférico, mostrando boas perspectivas também para o tratamento da LME (Byrnes *et al.*, 2005; Stemer; Huisa; Zivin, 2010; Huang *et al.*, 2012; Ando *et al.*, 2013; Masoumipoor *et al.*, 2014; Abreu; Nicolau, 2015; Blivet *et al.*, 2018). A PBM ativa mecanismos fotobioestimulantes que exercem efeitos benéficos, e incluem diminuição do edema, da hiperemia local e de células inflamatórias, associados ao aumento da proliferação e hipertrofia das células gliais, além de promover a regeneração tecidual (Dvorak *et al.*, 2015).

Considerando o exposto, este estudo objetivou avaliar a aplicação da fotobiomodulação na fase inicial do processo de reparo tecidual de LM induzida em ratos, com foco em análises histológicas dos rins, visando ampliar o conhecimento sobre o potencial terapêutico da PBM nesse contexto.

Metodologia

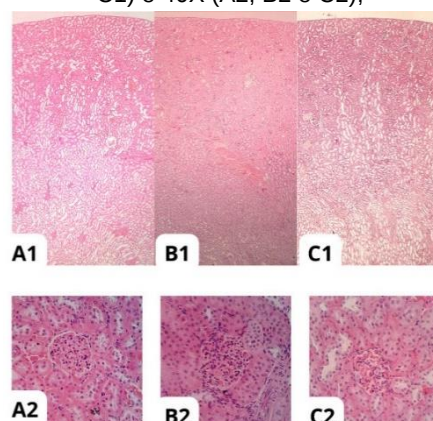
Este estudo foi realizado nos laboratórios de Histologia e Terapia Regenerativa e de Bioestimulação e Reparo Tecidual do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (A8-CEA-2022). Foram utilizados 15 ratos machos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albicus*), com idade de 60 dias e peso médio de 300 ± 20 g, alojados em gaiolas de polipropileno, sob ciclo de luz claro-escuro (12:12), temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ$ C) e com acesso livre a ração e água. Os animais foram alocados, aleatoriamente, em três grupos ($n=5/\text{grupo}$): SHAM (controle, com procedimentos cirúrgicos simulados), Lesão (indução de contusão medular) e PBM (indução de contusão medular seguida de fotobiomodulação). Os grupos foram avaliados no tempo experimental de 14 dias, com eutanásia dos animais após esse período. A indução da lesão medular nos grupos Lesão e PBM foi realizada por intervenção cirúrgica sob anestesia com isoflurano, administrado inicialmente a 4% e mantido a 2% durante o procedimento. A exposição da medula espinhal foi feita por laminectomia na região entre T9 e T10, seguida por trauma direto induzido por queda livre de um peso (10 g), a uma altura de 25 mm, sobre a medula exposta, retirado após 20 segundos. No grupo SHAM foi realizada a intervenção cirúrgica seguindo os mesmos procedimentos anestésicos e a simulação da Lesão medular. Após os procedimentos cirúrgicos, os tecidos foram suturados e os animais receberam tratamento profilático (5 dias) com antibiótico terapia (Enrofloxacino), analgesia (Cloridrato de Tramadol) e anti-inflamatório (Dipirona). Os animais do grupo PBM foram submetidos à fotobiomodulação após a indução da Lesão medular, em dias alternados, utilizando o equipamento Laser Therapy EC (DMC, São Carlos, Brasil), no comprimento de onda 808 nm, de forma transcutânea e perpendicular à pele, em dois pontos ao longo da incisão (20 segundos por ponto), utilizando os equipamentos de proteção individual preconizados. Os animais foram eutanasiados com superdosagem de Cloridrato de Cetamina e Cloridrato de Xilazina seguida de Cloreto de Potássio a 10% via intracardíaca. As amostras de interesse (tecido renal) foram coletadas e fixadas em formalina tamponada (10%) e processadas para obtenção de três cortes histológicos de 5 μ m por animal, corados com Hematoxilina e Eosina para análise

qualitativa do tecido renal por meio de imagens microscópicas digitais processadas pelo software ImageJ.

Resultados

Após os procedimentos cirúrgicos e preparação adequada das amostras, foram produzidas lâminas histológicas dos rins dos grupos SHAM, Lesão e PBM. A análise qualitativa foi realizada por meio de microscópio de luz e as imagens capturadas em diferentes aumentos (4X, 10X e 40X).

Figura 1: Quadro comparativo entre os Grupos SHAM (A), Lesão (B) e PBM (C) com aumentos de 4X (A1, B1 e C1) e 40X (A2, B2 e C2),



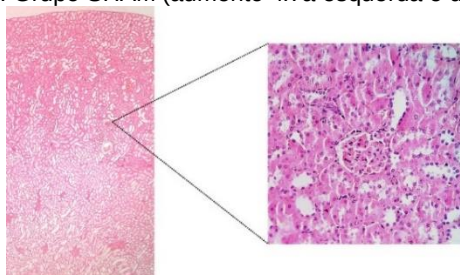
Fonte: O autor, 2024.

Nos animais do grupo SHAM, observou-se que as regiões cortical e medular apresentavam aspecto de normalidade. Focando na região cortical, tanto os túbulos contorcidos proximais e distais quanto os glomérulos renais demonstravam características histológicas padrão. Aspectos histológicos semelhantes foram visualizados na porção medular, onde estão localizados a alça de Henle e o tubo coletor (Figuras 1A1 e A2 e Figura 2).

Por sua vez, a análise das características histológicas do grupo Lesão demonstraram redução na espessura da região cortical em relação ao observado no grupo SHAM. Foram, ainda, detectadas alterações nos túbulos contorcidos proximais, que se apresentavam congestionados, com perda dos limites intercelulares, também visível nos túbulos contorcidos distais. Além disso, foram observados, na região cortical, glomérulos renais em processo de degeneração e, em alguns casos, essas estruturas apresentavam células com cariopícnose, cariorexe e cariólise, que caracterizam o início do processo de necrose (Figuras 1B1 e 1B2 e Figura 3).

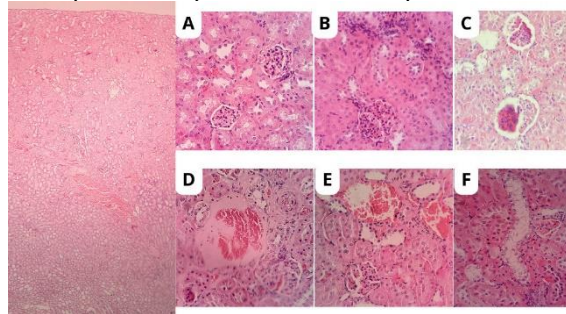
Alterações histológicas distintas foram verificadas no grupo PBM, e embora espessura da região cortical também apresentasse redução em comparação à medular, essa alteração era discreta. Os túbulos coletores proximais e os distais apresentavam-se discretamente congestionados, e em quantidade reduzida comparados aos do grupo Lesão. Por sua vez, foram visualizados esparsos glomérulos em processo de degeneração, mas não se detectou o processo de necrose em nenhuma dessas estruturas (Figuras 1C1 e 1C2 e Figura 4).

Figura 2: Grupo SHAM (aumento 4x à esquerda e de 40x à direita).



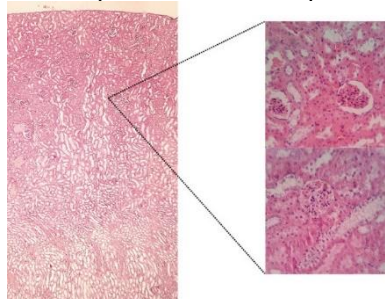
Fonte: O autor, 2024.

Figura 3: Grupo Lesão (aumento 4x à esquerda e de 40x à direita).



Fonte: O autor, 2024.

Figura 4: Grupo PBM (aumento 4x à esquerda e de 40x à direita).



Fonte: O autor, 2024.

Discussão

São escassas as publicações de artigos científicos que abordem a análise das estruturas histológicas do rim após tratamentos alternativos em casos de Lesão medular (Gris, 2008). Portanto, os resultados obtidos no presente estudo, que objetivou avaliar a aplicação da fotobiomodulação na fase inicial do processo de reparo tecidual de LM induzida em ratos, são pioneiros quanto a análise histológicas após aplicação do protocolo inovador com PBM no tratamento desse agravo.

O processo inflamatório desempenha um papel crucial na patogênese das lesões secundárias após trauma medular, afetando adversamente órgãos distantes como os rins. Estudos destacam que a ativação imunológica exacerbada após Lesão medular pode desencadear uma resposta inflamatória sistêmica, contribuindo para disfunções orgânicas generalizadas, incluindo a renal (Noble *et al.*, 2019). A fotobiomodulação emerge como uma estratégia eficaz para modular essa resposta imunológica, reduzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6, o que pode proteger os tecidos renais da inflamação secundária e do dano associado (Anders *et al.*, 2014).

Além disso, a regeneração celular é crucial para restaurar a função renal após dano ou Lesão tecidual. Assim, fotobiomodulação na medula espinhal poderia ativar processos bioquímicos que favorecem a proliferação de células progenitoras e a regeneração tecidual. Estudos experimentais indicam que essa terapia pode aumentar a expressão na medula espinhal de fatores de crescimento como FGF-2 e VEGF, envolvidos na angiogênese e na regeneração celular, potencialmente beneficiando a integridade estrutural dos túbulos renais e a função de filtração glomerular prejudicada pela inflamação e fibrose (Kuffler *et al.*, 2016).

Adicionalmente, a formação de cicatrizes nos tecidos renais após Lesão medular pode comprometer significativamente a função renal. A fotobiomodulação demonstra potencial para reduzir a deposição de matriz extracelular e formação de fibrose, criando um ambiente tecidual mais favorável à regeneração (Wang *et al.*, 2020). Estudos histológicos sugerem que o laser infravermelho pode modular a atividade de fibroblastos e a síntese de colágeno, mitigando a formação de cicatrizes nos rins e melhorando a função renal a longo prazo.

Os achados histológicos revelam que as alterações renais no grupo Lesão quando comparadas as do grupo PBM, que compreenderam redução da espessura da região cortical e a degeneração glomerular observadas, provavelmente resultam das respostas inflamatórias e hemodinâmicas sistêmicas provocadas pela lesão medular (Bonavia, 2018). Ao analisar as imagens do grupo tratado com PBM, tem-se que este protocolo de tratamento se mostrou eficaz em reduzir as consequências da lesão medular, sugerindo a efetividade da fototerapia na promoção da regeneração tecidual da medula lesionada e recuperação do controle autônomo desse órgão. Essas ações se refletiriam nos achados histológicos observados neste estudo, que indicam redução nas complicações sistêmicas, no grupo PBM, resultando em menor congestão nos túbulos contorcidos proximais e distais, preservando os glomérulos renais e demais estruturas desse órgão, comparado ao grupo Lesão.

No entanto, cabe ressaltar que no presente estudo a aplicação terapêutica de fotobiomodulação ocorreu de forma localizada na região entre T9-T10 da medula espinhal, visto que o objetivo foi avaliar se esse protocolo de tratamento poderia atuar na recuperação das funções associadas ao sistema nervoso somático, em relação à recuperação dos movimentos, mas também do sistema nervoso autônomo, responsável pelo funcionamento adequado das vísceras, com efeitos benéficos indiretos nos rins. Isso sugere que a PBM, favorece indiretamente a manutenção das estruturas renais por meio de sua ação no processo de reparo da lesão na medula espinhal, evidenciando ser uma abordagem promissora para proteger os rins em casos de LM.

Assim, os resultados promissores observados neste estudo incentivam a ampliação e a continuidade de pesquisas com o objetivo de validar um protocolo de tratamento com fotobiomodulação, com tempo de observação prolongado, que permita avaliar a evolução das estruturas histológicas renais para o funcionamento renal, considerando suas características de não ser invasivo, de custo reduzido, não invasivo e que poderia em um período experimental ao longo do tratamento com fotobiomodulação em LME.

Conclusão

Considerando o objetivo proposto no presente estudo e os resultados obtidos nas condições experimentais empregadas pode-se concluir que a aplicação da fotobiomodulação na fase inicial do processo de reparo tecidual de lesões medulares experimentais induzidas em ratos, demonstrou redução das alterações histológicas no tecido renal no grupo tratado com PBM comparadas às detectadas no grupo lesionado e não tratado (Lesão).

Dessa forma, a fotobiomodulação aplicada localmente na região da Lesão lar não visa somente a recuperação dos movimentos, mas também ao controle de funções orgânicas importantes, como a exercida pelos rins. A redução da inflamação sistêmica pode promover a regeneração celular e minimizar a formação de cicatrizes nos tecidos renais, demonstrando que essa abordagem terapêutica se apresenta promissora para preservar a estrutura e função dos rins após trauma medular. Com base nas evidências discutidas, a fotobiomodulação emerge como uma ferramenta valiosa para, no futuro, melhorar os desfechos clínicos e a qualidade de vida de pacientes afetados por lesões medulares.

Referências

- Abreu, E. M. C.; Nicolau, R. A. Terapia a laser de baixa intensidade na regeneração do tecido nervoso após Injury medular. **Rev. Neurocienc.**, v.23, n.2, p.297-304, 2015.
- Ando, Takahiro et al. Low-level laser therapy for spinal cord injury in rats: effects of polarization. **J. Biomed. Opt.**, v.18, n.9, p.098002, 2013.
- Bao, Feng et al. CD11d integrin blockade reduces the systemic inflammatory response syndrome after spinal cord injury. **Experimental neurology**, v. 231, n. 2, p. 272-283, 2011.
- Blivet, Guillaume et al. Neuroprotective effect of a new photobiomodulation technique against A β 25–35 peptide–induced toxicity in mice: Novel hypothesis for therapeutic approach of Alzheimer's disease suggested. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, v. 4, p. 54-63, 2018.
- Bonavia, Anthony; SINGBARTL, Kai. A review of the role of immune cells in acute kidney injury. **Pediatric Nephrology**, v. 33, p. 1629-1639, 2018.

Cripps, R. A. et al. A global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: towards a living data repository for injury prevention. **Spinal Cord**, v.49, n.4, p.493-501, 2011.

Disabato, Damon J. et al. System failure: Systemic inflammation following spinal cord injury. **European journal of immunology**, v. 54, n. 1, p. 2250274, 2024.

Dvorak, M. et al. The influence of time from injury to surgery on motor recovery and length of hospital stay in acute traumatic spinal cord injury: an observational Canadian cohort study. **J. Neurotrauma**, v.9, n.1, p.645-54, 2015.

Enengl, Joachim; HAMBLIN, Michael R.; DUNGEL, Peter. Photobiomodulation for Alzheimer's disease: Translating basic research to clinical application. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 75, n. 4, p. 1073-1082, 2020.

Greenwell, Mark W. et al. Kidney disease as a predictor of mortality in chronic spinal cord injury. **American journal of kidney diseases**, v. 49, n. 3, p. 383-393, 2007.

Gris, Denis; Hamilton, Eilis F.; Weaver, Lynne C. The systemic inflammatory response after spinal cord injury damages lungs and kidneys. **Experimental neurology**, v. 211, n. 1, p. 259-270, 2008.

Hu, R. et al. Glial scar and neuroregeneration: histological, functional, and magnetic resonance imaging analysis in chronic spinal cord injury. **J. Neurosurg. Spine**, v.13, n.2, p.169-80, 2010.

Khankan, R. R.; WANNER, I. B.; PHELPS, P. E. Olfactory ensheathing cell-neurite alignment enhances neurite outgrowth in scar-like cultures. **Exp. Neurol.**, v.269, p.93-101, 2015.

Krueger, H. et al. The economic burden of traumatic spinal cord injury in Canada. **Chronic. Dis. Inj. Can.**, v.33, n.3, p.113-22, 2013.

Lee, B. B. et al. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. **Spinal Cord**, v.52, n.2, p.110-6, 2014.

Lee-Liu, D. et al. **Spinal cord regeneration: Lessons for mammals from non-mammalian vertebrates.** **Genesis**, v.51, n.8, p.529-44, 2013.

Li Ziyu et al. Fibrotic scar after spinal cord injury: crosstalk with other cells, cellular origin, function, and mechanism. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 15, p. 720938, 2021.

Masoumipoor, M. et al. Effects of 660 nm low level laser therapy on neuropathic pain relief following chronic constriction injury in rat sciatic nerve. **Arch. Neurosci.**, v.1, n.2, p.76-81, 2014.

National Spinal Cord Injury Statistical Center. Spinal cord injury facts and figures at a glance. **J. Spinal Cord Med.**, v.37, n.1, p.117-8, 2014. (sem especificação do autor).

Nengl, Joachim; HAMBLIN, Michael R.; DUNGEL, Peter. Photobiomodulation for Alzheimer's disease: Translating basic research to clinical application. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 75, n. 4, p. 1073-1082, 2020.

Parvin, Shangrila et al. Spinal cord injury increases pro-inflammatory cytokine expression in kidney at acute and sub-chronic stages. **Inflammation**, v. 44, n. 6, p. 2346-2361, 2021.

Paula, A. A. et al. Low-intensity laser therapy effect on the recovery of traumatic spinal cord injury. **Lasers Med. Sci.**, v.29, n.6, p.1849-59, 2014.

Singh, A. et al. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. **Clin. Epidemiol.**, v.6, p.309-31, 2014.

Soderblom, Cynthia et al. Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 34, p. 13882-13887, 2013.

Wulf, Mariah J.; TOM, Veronica J. Consequences of spinal cord injury on the sympathetic nervous system. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 17, p. 999253, 2023.



Educação: ferramenta essencial para um mundo justo, sustentável e inclusivo