

Universidade Federal de Juiz de Fora

FABIANA APARECIDA MAYRINK DE OLIVEIRA

**O EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA FIBROSE
INTERSTICIAL RENAL**

**Juiz de Fora
2011**

FABIANA APARECIDA MAYRINK DE OLIVEIRA

**O EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA FIBROSE
INTERSTICIAL RENAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre. Área de concentração: Saúde Brasileira.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Hélydy Sanders Pinheiro

**Juiz de Fora
2011**

Oliveira, Fabiana Aparecida Mayrink de.

O Efeito do laser de baixa intensidade na fibrose intersticial renal
/ Fabiana Aparecida Mayrink de Oliveira. – 2011.
100 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Brasileira)—Universidade
Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

1. Nefrologia. 2. Laser – Efeitos adversos I. Título.

CDU 616.61

Fabiana Aparecida Mayrink de Oliveira

**O EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA FIBROSE
INTERSTICIAL RENAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Saúde – área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Saúde. Aprovada em ____ de _____ de 2011, pela Banca Examinadora composta por:

Prof^a. Dr^a Hélady Sanders Pinheiro
UFJF

Prof^a. Dr^a Patricia Semedo
UNIFESP

Prof. Dr. Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira
UFJF

Ao meu filho Rubem, razão da minha existência.

Ao meu esposo Marcelo, amor e apoio incondicionais.

Aos meus Pais, Clóvis e Zélia, exemplos de dignidade e honra.

Aos meus irmãos Dú, Serginho e Aninha companheiros da vida toda.

Agradecimentos

À Deus, por esta oportunidade;

De forma especial, à minha orientadora prof^ª Dr^a Hélydy Sanders Pinheiro, pela dedicação, incentivo e solidariedade. Sendo um exemplo de ética e pesquisadora;

Ao prof. Niels Olsen Saraiva Camara, pelo apoio e valiosas contribuições a este trabalho;

As professoras Dr^a Vera Maria Peters e Dr^a Martha Guerra Oliveira pela dedicação e ensinamentos importantes para minha formação acadêmica;

Aos companheiros que tornaram a vida mais fácil, Matheus Correa Costa, Patrícia Semedo e Marcos Antônio Cenezede;

Ao prof. Dr. Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira pela valiosa contribuição na aquisição das imagens;

Aos professores Dr. Marcus Gomes Bastos e Dr. Luiz Carlos Ferreira de Andrade, pelo apoio;

A prof^ª Darcília Nagem, pela dedicação aos alunos da pós-graduação;

Ao prof. Dr. Rodrigo Guerra de Oliveira, por me apresentar à laserterapia e pela amizade;

As acadêmicas do curso de Medicina da UFJF Ana Carolina Meneghin, Amanda Póvoa Paiva e Vânia Schinzel pelo empenho, decisivo para a realização deste trabalho;

Aos funcionários do CBR;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

Resumo

Justificativa e Objetivo: Independente da etiologia, a doença renal crônica (DRC) envolve fibrose generalizada e progressiva do tecido, atrofia tubular e a perda da função renal. Atualmente, as terapias eficazes para esta condição são escassas. Neste estudo, foram investigados os efeitos da terapia laser de baixa intensidade (LLLT) sobre a fibrose intersticial, que ocorre após obstrução ureteral unilateral (OUU) em ratos, um modelo experimental de doença renal crônica.

Materiais e Métodos: Foram utilizados 32 ratos Wistar, 8 em cada grupo, machos, com 250 a 300g de peso aproximadamente e 8 semanas de idade. O rim obstruído de metade dos ratos, submetidos à OUU receberam dose única intra-operatória do LLLT (AlGaAs laser, 780 nm, 22,5 J / cm², 30 mW, 30 segundos em cada um dos nove pontos). Após 14 dias, a fibrose renal foi avaliada pela coloração por picrossírius e medição da área transversal sob luz polarizada. Análise imunohistoquímica quantificou células do tecido renal que expressam marcadores de fibroblastos (FSP-1) e miofibroblastos (α -SMA). RT-PCR foi realizado para determinar a expressão de mRNA de genes chaves relacionados com a fibrose: TGF- β 1, Smad3 e colágeno I (Col I).

Resultados: No grupo OUU e tratado pelo LLLT os animais apresentaram menos fibrose renal do que os animais obstruídos (OUU). α -SMA, TGF- β 1 e Smad3 foram aumentados no interstício renal de ratos OUU. LLLT reduziu a expressão de todas essas moléculas. LLLT não parece ter um efeito significativo no Col I ou FSP-1, que também foram induzidos por OUU.

Conclusão: Pela primeira vez, nós mostramos que LLLT tem um efeito protetor em relação à fibrose intersticial renal. Entende-se que, atenuando a inflamação, a

laserterapia pode impedir a ativação tubular e transdiferenciação, que são os dois processos principais que formam a fibrose renal no modelo OUU.

Palavras-Chave: Terapia de laser de baixa intensidade, obstrução ureteral, fibrose renal, doença renal crônica, fator transformador de crescimento beta, proteínas smad, alfa-actina de músculo liso.

ABSTRACT

Background and Objective: Regardless of the etiology, chronic kidney disease (CKD) involves progressive widespread tissue fibrosis, tubular atrophy and loss of kidney function. At present, effective therapies to this condition are lacking. We investigated the effects of low level laser therapy (LLLT) on the interstitial fibrosis that occurs after unilateral ureteral obstruction (UUO) in rats, an experimental model of CKD.

Study Design/Materials and Methods: We used 32 Wistar rats, 8 in each group, males, 250 to 300g weight and 8 weeks old. The occluded kidney of half of the Wistar rats that underwent UUO received a single intraoperative dose of LLLT (AlGaAs laser, 780 nm, 22.5 J/cm², 30 mW, 30 seconds on each of nine points). After 14 days, renal fibrosis was assessed by Sirius red staining and measurement of the cross-sectional area under polarized light. Immunohistochemical analyses quantitated the renal tissue cells that expressed fibroblast (FSP-1) and myofibroblast (α -SMA) markers. RT-PCR was performed to determine the mRNA expression of key fibrosis-related genes, namely TGF- β 1, Smad3 and collagen I (Col I).

Results: The UUO-LLLT animals had less severe renal fibrosis than OUU animals. α -SMA, TGF- β 1 and Smad3 were increased in the renal interstitium of UUO rats. LLLT reduced the expression of all of these molecules. LLLT did not appear to have a significant effect on Col I or FSP-1, which were also induced by UUO.

Conclusion: For the first time, we showed LLLT had a protective effect regarding renal interstitial fibrosis. It is conceivable that by attenuating inflammation, LLLT can prevent tubular activation and transdifferentiation, which are the two processes that mainly drive the renal fibrosis of the UUO model.

Keywords: low-level laser therapy, ureteral obstruction; renal fibrosis; chronic kidney failure; transforming growth factor beta; smad proteins; alfa-smooth muscle actin.

Lista de Abreviaturas

α -SMA: alfa-actina de músculo liso (*alpha – smooth muscle actin*)

λ : lambda

ARAs: antagonistas dos receptores da angiotensina

AsGaAL: arseneto de gálio e alumínio

ATP: adenosina tri-fosfato

BMP-7: proteína morfogênica óssea 7 (*bone morphogenic protein 7*)

Ca-ATPase: Cálcio-Adenosina trifostase (*Calcium ATPase*)

cDNA: DNA complementar

DRC: doença renal crônica

EGF: fator de crescimento epitelial (*epithelial growth factor*)

EROs: espécie Reativa de Oxigênio

FI/AT: fibrose Intersticial/Atrofia Tubular

FPR: fluxo plasmático renal

FSP1: proteína específica de fibroblastos 1 (*fibroblast specific protein 1*)

FSR: fluido sangüíneo renal

He-Cd laser: laser de Hélio-Cádmio

He-Ne laser: laser de Hélio-Neônio

HPRT: Hipoxantina-Guanina fosfo-ribosiltransferase (*hypoxanthine guanine phospho ribosyltransferase*)

iECA: inibidores da enzima conversora de angiotensina

IGF: fator de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like growth factor*)

J/cm²: Joule/centímetros quadrados

LLLT: laser de baixa intensidade (*low level laser therapy*)

MBT: Membrana basal tubular

MCP-1: proteína quimiotática de macrófago 1 (*monocyte chemotactic protein-1*)

MEC: matriz extra-celular

MMP2: matriz de metaloproteinase 2

MMP9: matriz de metaloproteinase 9

mW: mili watts

Nd:YAG laser: Laser de Neodímio YAG (ítrio-alumínio-gálio)

NKF: *National Kidney Foundation*

nm: nanômetros

OOU: obstrução ureteral unilateral

PCR-RT: reação de polimerase em cadeia (*polimerase chain reaction*)

PDGF: fator de crescimento derivado de plaqueta (*platelet-derived growth factor*)

RNA: ácido ribonucléico

TEM: transição epitélio-mesenquimal

TFG: taxa de filtração glomerular

TGF-β1: fator de crescimento transformador beta 1 (*transforming growth factor beta 1*)

TME: transição mesenquimal-epitelial

W/cm²: watts/cm²

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema representativo do fenômeno TEM	24
Figura 2: Esquema representativo de luz coerente e luz incoerente.....	27
Figura 3: Esquema representativo de luz colimada e luz não colimada	27
Figura 4: Esquema geral da cavidade ressonante do aparelho de produção da luz laser	28
Figura 5: Tipo de laser em relação à onda emitida: laser de onda contínua e onda pulsada	32
Figura 6: Esquema demonstrativo do comprimento de onda da luz laser	34
Figura 7: Esquema do protocolo experimental para os grupos 1, 2, 3 e 4	41

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	X
LISTA DE FIGURAS	XII
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 A FIBROSE INTERSTICIAL E ATROFIA TUBULAR	18
1.2 EMBRIOGÊNESE RENAL	20
1.3 O FENÔMENO DE TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL - EMBRIOGÊNESE REVERSA	22
1.4 O MODELO DE OBSTRUÇÃO URETERAL UNILATERAL	25
1.5 O LASER DE BAIXA INTENSIDADE	26
1.5.1 Conceito do laser	26
1.5.2 Mecanismos de ação do LLLT	29
1.5.3 Parâmetros da dose na LLLT	31
1.5.3.1 Tipo de laser	31
1.5.3.2 Comprimento de Onda	32
1.5.3.3 Densidade de energia ou fluência ou energia	34
1.5.3.4 Tempo de duração	35
1.5.3.5 Densidade de Potência ou irradiância	35
2 OBJETIVOS	37
3 MATERIAL E MÉTODO	38
3.1 ANIMAIS	38
3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO URETERAL UNILATERAL	38
3.3 LASER DE BAIXA INTENSIDADE	39
3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	40
3.5 PARÂMETROS AVALIADOS	41
3.5.1 Peso	41
3.5.2 Fibrose Renal	42
3.5.2.1 Preparo do Material	42
3.5.2.2 Análise histomorfométrica	43
3.5.3 Identificação de células relacionadas a TEM – miofibroblastos e fibroblastos	44
3.5.4 Genes pró-fibróticos	45
3.6 Análise Estatística	47
4 RESULTADOS	48
5 CONCLUSÃO	51
6 REFERÊNCIAS	52

1 Introdução

A doença renal crônica (DRC) atinge atualmente cerca de 1,8 milhões de pessoas em todo mundo. Devido ao rápido e grande aumento de sua incidência e prevalência já se tornou um grave problema de saúde pública mundialmente (BARSOU, 2006; LEVEY *et al.*, 2007). É considerada um processo que evolui para seu estágio terminal, classificado como estágio 5, no qual o paciente dependerá ao longo da vida de terapias renais substitutivas tais como, hemodiálise, diálise peritoneal ou o transplante renal (LIU, 2004; REMUZZI *et al.*, 2006). A DRC ainda não é diagnosticada precocemente, em parte pelo desconhecimento de clínicos e especialistas da definição e classificação das fases de progressão da DRC, já estabelecidas pela *National Kidney Foundation (NKF)* desde 2002, e também pela falta de uniformidade na aplicação simples de testes de detecção e avaliação da doença (K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification, 2002; LEVEY *et al.*, 2003). Quando não detectada, a DRC progride e leva à diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) o que leva à hipertensão, anemia, desnutrição, doença óssea, neuropatia, doença cardiovascular e diminuição da qualidade de vida, sendo, portanto uma doença extremamente grave (LEVEY *et al.*, 2003). Mesmo depois do transplante renal, uma condição histopatológica crônica e progressiva não-específica, acomete o rim transplantado, a fibrose intersticial e atrofia tubular (FI/AT), característica comum da DRC (HALLORAN *et al.*, 1999; PASCUAL *et al.*, 2002; NANKIVELL *et al.*, 2003). A FI/AT no transplantado está associada com significativa morbidade e mortalidade (HALLORAN *et al.*, 1999; WOLFE *et al.*, 1999; KAPLAN, MEIER-KRIESCHE, 2002).

Vários fatores de risco associados à DRC como hipertensão, diabetes mellitus, proteinúria maior que 1,5g/24h, obesidade, hiperlipidemia, fumo, dietas ricas em

proteínas, retenção de fosfato, acidose metabólica, infecções, doenças auto-imunes, toxinas, radiação e danos mecânicos quando persistentes resultam em inflamação crônica do tecido renal culminando com lesão e disfunção deste. (KLAHR *et al.*, 2003; WYNN, 2008).

A patogênese da DRC é caracterizada pela progressiva perda da função renal e FI/AT. Um mecanismo fisiopatológico importante da fibrose renal é a capacidade das células epiteliais tubulares diferenciarem-se em fibroblastos/miofibroblastos num processo denominado transição epitélio mesenquimal (TEM). Este mecanismo é em essência um processo de embriogênese reversa (LIU, 2004; QI *et al.*, 2006; ARESU *et al.*, 2008; SCHLONDORFF, 2008).

Resumidamente, o fenômeno de TEM acontece quando uma célula epitelial tubular sofre um dano. Inicia-se, então a liberação de mediadores inflamatórios tais como citocinas e quimiocinas, como a proteína quimiotática de macrófago-1 (MCP-1), que estimulam a proliferação e o recrutamento de células inflamatórias como macrófagos e leucócitos para o local do dano. Os macrófagos iniciam a liberação de fatores de crescimento, no qual o fator de crescimento transformador- β 1 (TGF- β 1) exerce papel crucial, e em resposta a ligação do TGF- β 1 ao seu receptor celular há a fosforilação do Smad2 e Smad3, membros da família de proteínas Smad. O aumento da expressão de Smad2 e Smad3 resulta em aumento da TEM (LIU, 2004; LI *et al.*, 2007). As células epiteliais tubulares começam a expressar a vimentina, um marcador de células mesenquimais, inexistente nas células epiteliais e diminuem a expressão de E-caderina, que é uma proteína de adesão do epitélio, levando à desestabilização da integridade da membrana basal tubular (MBT) (YANG *et al.*, 2001). Com a ruptura da membrana, as células agora indiferenciadas, começam expressar proteína específica de fibroblastos-1 (FSP-1) e alfa-actina (α -SMA), marcadores de fibroblastos e

miofibroblastos respectivamente, e passam apresentar habilidade contrátil, efetuando grande migração e invasão para o interstício, aumentando a produção de componentes da matriz extra-celular (MEC) como colágeno tipo I e III, vimentina, fibronectina, matriz de metaloproteinase-2 (MMP-2), MMP-3, MMP-9 (LI *et al.*, 2003; BANIHANI *et al.*, 2008; WYNN, 2008).

Assim como no fenômeno TEM, a proteinúria, em nefropatias crônicas, também leva ao aumento de TGF- β 1, acúmulo de células inflamatórias e produção de miofibroblastos, o que induz uma resposta fibrogênica intersticial renal, sendo portanto, isoladamente, uma outra alça de lesão crônica renal (WANG *et al.*, 1997; REMUZZI *et al.*, 1998; ABBATE *et al.*, 2002).

A evolução na estratégia terapêutica está associada com a identificação das causas da FI/AT no transplante crônico (CORNELL *et al.*, 2005; BEDI *et al.*, 2008). Fármacos, como os inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) e os antagonistas dos receptores da angiotensina (ARAs), tem sido usados para inibir ou pelo menos prevenir a progressão da fibrose intersticial renal (MEZZANO *et al.*, 2001; BOFFA *et al.*, 2003; SCHANSTRA *et al.*, 2003; GROSS *et al.*, 2004). Outros exemplos são as estatinas, o micofenolato mofetil, a eritropoietina e a rapamicina que têm sido utilizados em modelos experimentais de doença renal com fibrose intersticial apresentando um efeito antiinflamatório e antifibrótico melhorando a função renal sendo, portanto renoprotetores (MIZUGUCHI *et al.*, 2004; BONEGIO *et al.*, 2005; KRAMER *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2007).

Entretanto, não se conhece tratamento efetivo que iniba completamente o progressivo declínio da função renal. Assim, novas formas de prevenir a progressão da FI/AT devem ser pesquisadas (LIU, 2004; SCHLONDORFF, 2008).

A terapia de laser de baixa intensidade (*low level laser therapy - LLLT*) tem efeitos anti-oxidantes, antiinflamatórios e antifibróticos mostrando-se bastante promissora na regressão de lesões agudas e crônicas (LIRANI *et al.*, 2005; BJORDAL *et al.*, 2008).

Uma série de condições patológicas tem sido tratadas com LLLT, como lesões vasculares, acne, vitiligo, lesões pigmentadas superficiais da pele, remoção de nódulos fibróticos da mama após mamoplastia, tendinopatia lateral do cotovelo e aumento no reparo ósseo (NUSSBAUM, 1999; LIRANI *et al.*, 2005; YAMASHITA *et al.*, 2006; BJORDAL *et al.*, 2008; BOIXEDA *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2008). A LLLT age também em estruturas mais profundas do organismo. Em estudos experimentais com ratos o LLLT reduziu a área de infarto do miocárdio, do acidente vascular encefálico e gastrite crônica atrófica, bem como apresentou resultados benéficos na evolução da doença cardíaca isquêmica avançada em humanos (ORON *et al.*, 2001; SHAO *et al.*, 2005; ORON *et al.*, 2006; ZYCINSKI *et al.*, 2007).

A grande diversidade em efeitos com LLLT deve-se ao processo fotoquímico, que ocorre na interação com o tecido biológico, baseado na excitação do estado eletrônico do átomo ou molécula pela irradiação da luz (HU *et al.*, 2007). Como resultado tem-se um impacto direto nos mecanismos intracelulares e ativação do processo de reparo tecidual independente de calor e sem dano ao tecido (ZYCINSKI *et al.*, 2007).

Dependendo dos parâmetros da dose, o LLLT pode apresentar efeito antiinflamatório, pois, numa primeira hipótese ele impede a reação inflamatória severa e nociva e, por isso, leva ao aumento da formação de fibras colágenas de maneira mais organizada. Numa segunda hipótese o LLLT induziria a uma ligeira inflamação que levaria ao aumento da angiogênese ao redor do dano tecidual, como numa ferida de

pele, com subsequente aumento no fluído sanguíneo e assim otimizando a cicatrização cutânea (YASUKAWA *et al.*, 2007).

É fato bem estabelecido que, a inflamação resulta em dano oxidativo e que a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ser evento chave na alteração hemodinâmica de doenças, além de modular a resposta inflamatória (GERSCHMAN *et al.*, 1954; HALLIWELL *et al.*, 1994). De fato, vários estudos demonstraram que a LLLT é capaz de reduzir o estresse oxidativo em tecidos lesados e conseqüentemente da inflamação (YAAKOBI *et al.*, 2001; FILLIPIN *et al.*, 2005; RIZZI *et al.*, 2006).

Além do efeito antiinflamatório e antioxidante do LLLT, este também age na preservação da membrana mitocondrial, otimizando a respiração da mitocôndria e a síntese de ATP, deste modo células danificadas irradiadas pelo LLLT apresentam menor disfunção em conseqüência à manutenção da produção de energia (ORON *et al.*, 2001).

Este estudo pretende avaliar o possível efeito antiinflamatório e antifibrótico do LLLT na fibrose intersticial renal, mediada pelo fenômeno de TEM, avaliada no modelo de obstrução ureteral unilateral (OUU) esquerda.

1.1 A Fibrose Intersticial e Atrofia Tubular

Quando um indivíduo inicia disfunção renal leve, que geralmente é progressiva, insidiosa e assintomática, o rim progride para a fase mais avançada dessa disfunção, ou seja, no estágio terminal da DRC, onde os rins não conseguem mais manter a normalidade do meio interno do doente, devido à perda total da função (ST PETER *et al.*, 2003; ST PETER, 2007). A evolução das alterações na morfologia do órgão é caracterizada por progressiva perda e atrofia dos túbulos levando à substituição das células do parênquima renal por fibrose intersticial. A análise morfológica cuidadosa

revela que o comprometimento da função renal correlaciona-se melhor com a extensão do dano túbulo-intersticial do que com o grau de danos glomerulares ; (MULLER *et al.*, 1992; EDDY, 1996; ROBERTS *et al.*, 1997; SATOH *et al.*, 2001; OLIVER, 2002; LI *et al.*, 2007). A FI/AT é caracterizada pelo acúmulo de componentes da MEC e perda da arquitetura tubular. A excessiva deposição desses componentes deve-se principalmente a maior proliferação de células como os miofibroblastos que expressam *de novo* α -SMA e são provenientes de diferentes populações de fibroblastos como os fibroblastos residentes no interstício, fibrócitos circulantes, fibroblastos provenientes da TEM e os derivados da medula óssea (NG *et al.*, 1998; JINDE *et al.*, 2001; IWANO *et al.*, 2002; ZEISBERG *et al.*, 2004).

Existem algumas hipóteses sobre a origem das principais populações de fibroblastos adultos no interstício que efetivamente produzem a fibrose intersticial, representados pelos derivados da medula óssea e os provenientes da TEM (IWANO *et al.*, 2002). Uma hipótese sobre os primeiros é de que as células do estroma medular são progenitoras de fibroblastos/miofibroblastos e quando na presença de lesão, migram, através da circulação para órgãos periféricos e contribuem para o aumento da expressão de colágeno (PROCKOP, 1997; IWANO *et al.*, 2002). No entanto, esta contribuição difere nos vários órgãos. De maneira geral, acredita-se que uma porção significativa dos miofibroblastos pulmonares origina-se do estroma medular e em contraste, dados demonstram que nos rins e fígado a maioria dos miofibroblastos origina-se de células residentes, através do fenômeno TEM (KISSELEVA *et al.*, 2008). Esta, portanto, seria a outra hipótese, segundo a qual células epiteliais diferenciadas tornam-se indiferenciadas ou mesenquimais em resposta a uma lesão tecidual, para então apresentarem um fenótipo de fibroblastos e miofibroblastos, que aumentam a produção

de proteínas da MEC, levando à fibrose intersticial (HAYZUK, 1995; STRUTZ *et al.*, 1995).

Para compreender corretamente este fenômeno na fibrogênese renal é necessária a discussão de alguns conceitos sobre embriogênese do rim.

1.2 Embriogênese Renal

Diferentemente de outros órgãos parenquimatosos que são derivados de um folheto epitelial embrionário, o rim possui dois tecidos embrionários distintos que regulam a sua morfogênese: o broto uretérico, que forma o sistema coletor renal e o mesênquima metanéfrico, que se diferencia em células intersticiais tubulares e néfrons (HATINI *et al.*, 1996; HORSTER *et al.*, 1999). O mesênquima metanéfrico, constituído de células indiferenciadas que expressam vimentina, apóia a viabilidade, o crescimento, e a ramificação do broto uretérico para este formar o sistema coletor renal (MAESHIMA *et al.*, 2003). Em troca, o crescimento do broto uretérico ou o nascimento do sistema coletor induz o mesênquima metanéfrico a diferenciar em células epiteliais tubulares, glomerulares e néfrons (HATINI *et al.*, 1996; HORSTER *et al.*, 1999). A forma de interação e desenvolvimento desses dois tecidos é regulada por fatores de transcrição, protooncogenes, fatores de crescimento de polipeptídeos agindo como moléculas sinalizadoras e os receptores de ambos os tecidos (HORSTER *et al.*, 1999). Então, para a formação completa da morfogênese renal a maioria dos túbulos renais no rim adulto, exceto o sistema coletor, são derivados do mesênquima metanéfrico através da transição mesenquimal-epitelial (TME) (HORSTER *et al.*, 1999; LIU, 2004).

Neste processo a proteína morfogênica óssea-7 (BMP-7) exerce um papel estimulador na regulação da nefrogênese associada com a TME, enquanto que o TGF-

$\beta 1$ é supressor do crescimento morfogênico no rim em desenvolvimento (HOGAN, 1996; ZEISBERG *et al.*, 2004). Interessantemente, a TEM no rim adulto lesado ocorre em células originadas da linhagem derivada da TME (HERZLINGER, 2002). Em células epiteliais tubulares no adulto que estão em processo de TEM, a expressão de BMP-7 é substancialmente diminuída, enquanto que a expressão de TGF- $\beta 1$, o principal mediador da TEM é aumentada, exatamente o contrário do que ocorre no período embrionário (ZEISBERG *et al.*, 2003).

No tecido renal maduro e com características de normalidade, as células epiteliais tubulares são firmemente conectadas umas as outras, sobre a MBT, e matém a integridade epitelial através de vários mecanismos de adesão. A E-caderina, um receptor de adesão bem caracterizado e importante determinante da manutenção do fenótipo epitelial, exerce função essencial na manutenção da integridade e da polarização do epitélio renal (TEPASS *et al.*, 2000; LIU, 2004). A MBT separa células epiteliais dos miofibroblastos, pois estes estão localizados no interstício (NG *et al.*, 1998; LIU, 2004). (Figura 1).

Apenas no embrião, a perda ou dano no tecido são reparados sem inflamação, ou fibrose. Após o nascimento, o reparo está sempre associado com um processo inflamatório, tal como cicatriz ou fibrose progressiva. Desta forma, sem a regeneração do tecido original, um dano local no tecido segue um cenário bastante uniforme envolvendo a liberação ou geração de mediadores solúveis como quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento, aumento na permeabilidade vascular local, ativação de células endoteliais e migração de leucócitos (VIELHAUER *et al.*, 2001; MATSUI *et al.*, 2003; SCHLONDORFF, 2008).

1.3 O Fenômeno de Transição Epitélio-Mesenquimal – Embriogênese Reversa

Sabe-se que o epitélio maduro passa pelo fenômeno de plasticidade epitelial modificando seu fenótipo em resposta a um dano tecidual, seja devido à oncogênese ou um a processo crônico como a DRC (KALLURI *et al.*, 2003).

O quadro inflamatório num processo crônico é representado por células inflamatórias como macrófagos que expressam a proteína ED-1. Estes têm uma contribuição crucial na progressão da patogênese da FI/AT, pois quando estimulados para o reparo, passam a produzir fatores fibrogênicos como TGF- β 1, fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), a MCP-1, que são capazes de induzir uma modulação fenotípica de fibroblastos intersticiais em miofibroblastos culminando no aumento da produção de proteínas da MEC (NATHAN, 1987; NAKATSUJI *et al.*, 1998). Em consequência à lesão, células epiteliais tubulares também secretam fatores de crescimento como PDGF e TGF- β 1, além de expressarem antígenos que supostamente suscitam uma resposta imune mediada por células T em resposta a um dano (NAKATSUJI *et al.*, 1998; EDDY, 2000). (Figura 1).

A MBT é um importante componente estrutural dos túbulos renais e é constituído por laminina, heparan sulfato, proteoglicanas, fibronectina, entactina e a sua mais abundante macromolécula, o colágeno tipo IV (ERICKSON *et al.*, 2000; STAHL *et al.*, 2001; ZEISBERG *et al.*, 2002). Mediante a ação de células inflamatórias e fatores de crescimento supracitados e também de fator de crescimento epitelial (EGF) e proteases, como as metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, ocorre a ruptura da MBT através da quebra de colágeno tipo IV e laminina induzindo a mudança fenotípica das

células epiteliais e o início da TEM (IWANO *et al.*, 2002; ZEISBERG *et al.*, 2002; LIU, 2004). (Figura 1).

Assim, células epiteliais que em condições normais expressavam moléculas como E-caderina, durante o dano, perdem a polaridade e o seu mecanismo de adesão sofrendo uma mudança fenotípica. Elas passam a expressar, desta forma, *de novo* vimentina, perdem a citoqueratina e iniciam a produção acelerada de fibronectina e colágeno tipo I, o que indica que, sob estímulo elas passam a comportar como miofibroblastos (KALLURI *et al.*, 2003; LIU, 2004; ARESU *et al.*, 2008; BEDI *et al.*, 2008). (Figura 1).

A nefropatia experimental obstrutiva reproduz a DRC humana, pois se demonstrou que durante o dano, as células expressavam α -SMA e vimentina indicando a presença de transição entre epitélio-mesênquima-miofibroblasto/fibroblasto. Além disto, havia aumentada produção de componentes da MEC como colágeno tipo I e fibronectina (YANGLIU, 2001; 2002; LIU, 2004).

O TGF- β é atualmente considerado o principal promotor da patogênese da fibrose renal. Três isoformas em mamíferos têm sido identificadas, embora o TGF- β 1 tenha sido o mais extensivamente investigado na fibrose renal. Tanto as células residentes no rim, quanto o infiltrado de leucócitos podem estimular a produção deste fator de crescimento. Vários são os estímulos conhecidos para induzi-lo como o aumento na angiotensina II, endotelina-1, isquemia, glicose, insulina, fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e medicamentos como a ciclosporina. O TGF- β pode, também, ser filtrado do plasma durante a proteinúria (EDDY, 2000; ABBATE *et al.*, 2002; KLAHR *et al.*, 2003). Estudos clínicos e modelos animais de FI/AT indicam que fibroblastos e miofibroblastos derivam do epitélio tubular quando

submetidos à TEM sob forte influência do TGF- β 1 (NG *et al.*, 1998; JINDE *et al.*, 2001; RASTALDI *et al.*, 2002; MASSZI *et al.*, 2004). (Figura 1).

O α -SMA é uma proteína do citoesqueleto que é expressa nos miofibroblastos e o identifica. Em rins normais há pouca expressão de α -SMA, mas quando há nefropatia progressiva com fibrose renal mediada pela TEM existe notável aumento da expressão de α -SMA indicando que, os miofibroblastos intersticiais participam intensamente do processo fibrótico e da atrofia tubular tanto em modelos experimentais quanto em humanos (JOHNSON *et al.*, 1991; ALPERS *et al.*, 1992; ESSAWY *et al.*, 1997; ROBERTS *et al.*, 1997; NAKATSUJI *et al.*, 1998). (Figura 1).

Além disto, a progressão da fibrose pode depender de um desequilíbrio entre a geração de proteínas da MEC e a sua degradação. Esse desequilíbrio parece estar relacionado com a supressão de metaloproteinases ou ativação de inibidores de metaloproteinases (NAKATSUJI *et al.*, 1998; KAWAMOTO *et al.*, 2006). O desenvolvimento da fibrose pode estar associado, portanto, a alteração do metabolismo dos componentes da MEC, juntamente com a participação ativa dos miofibroblastos (NAKATSUJI *et al.*, 1998).

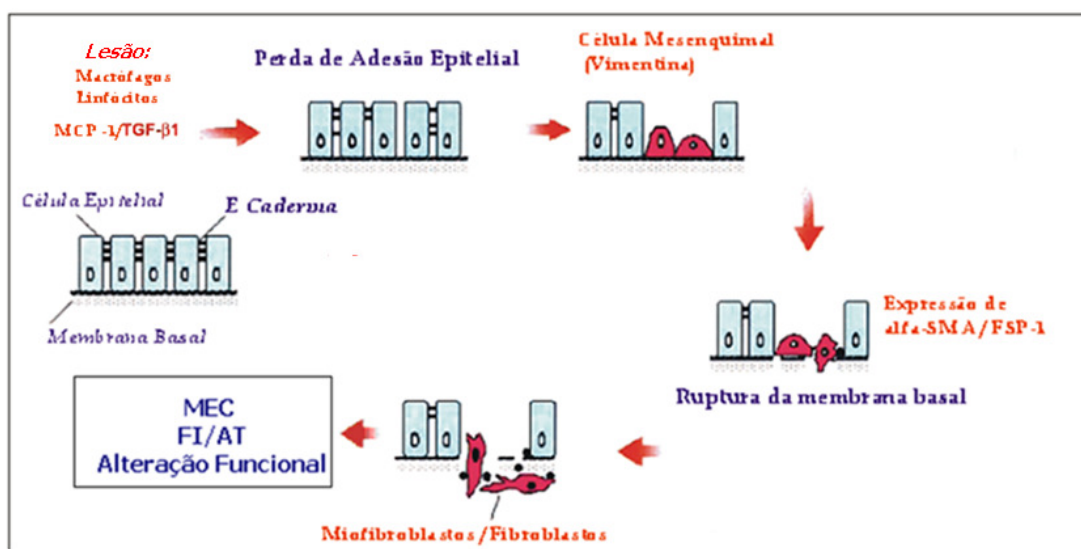


Figura 1. Esquema representativo do fenômeno TEM. Adaptado de LIU, 2004.

1.4 O modelo de Obstrução Ureteral Unilateral

Um elegante modelo experimental de inflamação e fibrose intersticial do rim que engloba muitos aspectos da DRC e que tem sido utilizado por muitos pesquisadores é o de obstrução ureteral unilateral (OUU) (KLAHR, 1991; KLAHR *et al.*, 2002; OLIVER, 2002). Evidências mostram que, neste modelo a resposta fibrótica é caracterizada pelo espessamento da MBT e pelo acúmulo de fibras de maneira generalizada no compartimento túbulo-intersticial, de modo comparável ao que ocorre na DRC humana (KANETO *et al.*, 1999; DOCHERTY *et al.*, 2006). A obstrução completa do ureter rapidamente leva à fibrose túbulo-intersticial tanto em modelos com ratos quanto em camundongos, com lesão evidente em 3 dias e já em 7 a 14 dias a fibrose encontra-se bastante avançada com aumento de proteínas da MEC tais como colágenos tipo I, III e IV, fibronectina, heparan sulfato e proteoglicanas (SATOH *et al.*, 2001; RODRIGUEZ-PENA *et al.*, 2002; DOCHERTY *et al.*, 2006). Além disto, o modelo de OUU é caracterizado por uma leve uremia transitória e pela ausência de hipertensão severa, ou seja, é de baixa morbidade e mortalidade (RODRIGUEZ-PENA *et al.*, 2002).

Nos primeiros 10 minutos da obstrução ureteral ocorre rápida vasodilatação no córtex estimulada por substâncias vasodilatadoras liberadas no ambiente como as prostaglandinas, quininas e óxido nítrico. Em seguida há vasoconstrição, que já se estende do córtex à medula através de substâncias vasoconstritoras liberadas como a angiotensina, tromboxanas, endotelina e o hormônio antidiurético (SWEENEY *et al.*, 2001; KLAHR *et al.*, 2002). Com 4 a 12h de obstrução, ocorre intensa infiltração de macrófagos no interstício que, aumenta no decorrer do tempo. Inicia-se também a infiltração de linfócitos T (DIAMOND, 1995; LANGE-SPERANDIO *et al.*, 2002). Em

18h da ligadura há grande diminuição do fluído sanguíneo renal (FSR) e da pressão ureteral. Até o fim das primeiras 24 h ocorre a diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG), da circulação do fluxo plasmático renal (FPR) e um aumento da pressão arterial (MOODY *et al.*, 1975; SWEENEY *et al.*, 2001; KLAHR *et al.*, 2002). A partir do segundo até o décimo dia há aumento na expressão de FSP-1 e acúmulo de colágeno tipo IV no interstício (VIELHAUER *et al.*, 2001). Uma diminuição em 50% dos glomérulos funcionantes ocorre no 5º dia da obstrução e de forma mais tardia começam a participar do mecanismo fisiopatológico os miofibroblastos, TGF- β 1 e a BMP-7 (KLAHR *et al.*, 2002; CHEVALIER, 2008).

Neste modelo de OUU para avaliar os mediadores inflamatórios e fibróticos da fibrose intersticial renal normalmente são feitas análises morfológicas, histológicas, imunohistoquímica e PCR (VIELHAUER *et al.*, 2001; PICARD *et al.*, 2008). Quando há uma pesquisa de função renal o ureter obstruído geralmente é liberado para realização da depuração de substâncias como inulina e o ácido para-amino-hipúrico (PAH) (YARGER *et al.*, 1980; ITO *et al.*, 2004). Pouco tem sido estudado sobre função renal com análise de proteinúria neste modelo (MICHLI *et al.*, 2007).

Através do modelo de OUU, é possível a detecção da inflamação intersticial e da FI/AT, achados comuns na DRC humana e pode, por tanto, ser utilizado para avaliação de propostas terapêuticas que modifiquem a fisiopatologia da DRC.

1.50 Laser de Baixa Intensidade

1.5.1 Conceito do laser

O laser é uma luz, ou seja, é uma onda ou radiação eletromagnética que apresenta comportamento dual onda/partícula, sendo a partícula denominada fóton. A luz laser possui características especiais que a distingue da luz comum como colimação,

coerência e monocromatismo. Uma luz não colimada diverge durante a sua propagação, diferente da luz colimada que se propaga paralelamente. Denomina-se coerência a propriedade das fases da luz propagarem-se de forma idêntica no espaço/tempo, diferentemente da luz incoerente e o monocromatismo é a capacidade de produzir um único comprimento de onda (RATZ, 1995; COLUZZI, 2004; SISTI *et al.*, 2006). (Figuras 2 e 3).

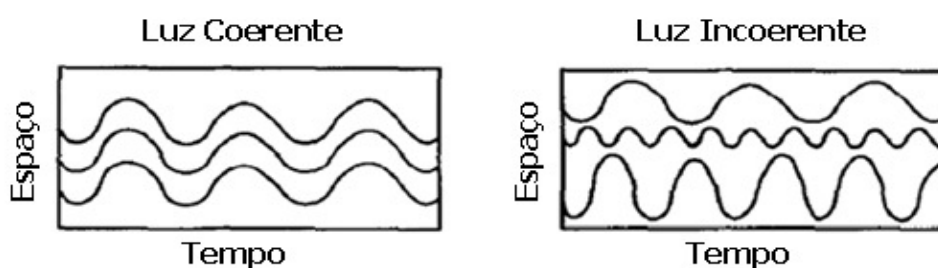


Figura 2. Na luz coerente, as fases da luz propagam-se de forma idêntica no espaço/tempo, diferentemente da luz incoerente. Adaptada de RATZ, 1995.

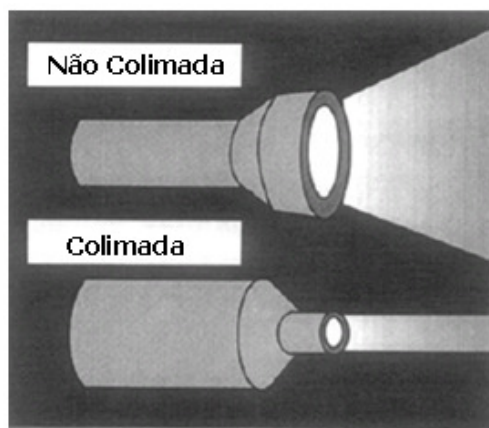


Figura 3. A luz não colimada emite feixes divergentes e a luz colimada feixes paralelos. Adaptada de RATZ, 1995.

Para produzir a luz laser é necessária uma cavidade ressonante com dois espelhos refletores, um com 100% de reflexão e outro com reflexão parcial. Dentro

dessa cavidade ressonante existe um meio ativo que pode ser líquido, gasoso, sólido ou associações desses estados. Este meio é excitado por bombeamento, a partir de uma fonte de energia externa, levando ao fenômeno de inversão de população, onde o elétron do átomo do meio ativo decai liberando um fóton. Este fóton excitará novo átomo fazendo com que ocorra um decaimento de elétrons com liberação de fótons idênticos em cascata que finalmente resulta na emissão estimulada de radiação (RATZ, 1995; COLUZZI, 2004). (Figura 4).

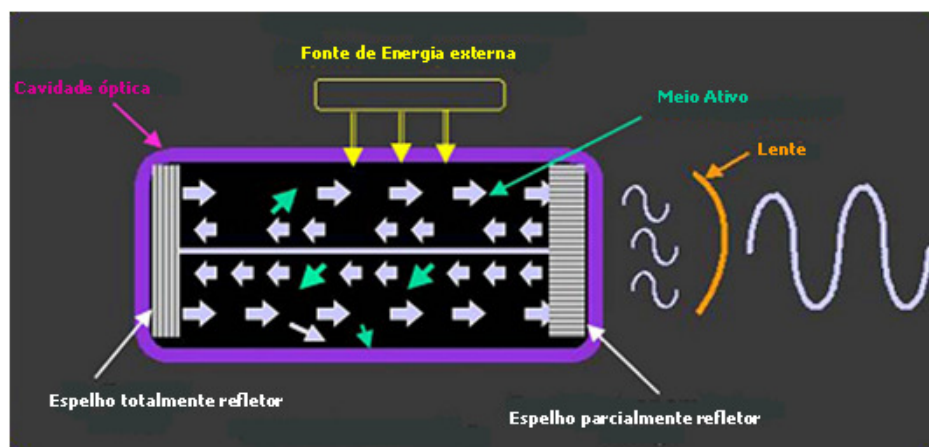


Figura 4. Esquema geral da cavidade ressonante do aparelho de produção da luz laser. Adaptado de COLUZZI, 2004.

Em relação à intensidade, existem dois tipos de laser um de alta e outro de baixa intensidade. O primeiro interage com o tecido, por exemplo, um tecido tumoral, produzindo um dano térmico letal, de aproximadamente 55-60°C, às células tumorais, a esta destruição térmica do tecido dá-se o nome de ablação (IZZU, 2003). Existem várias técnicas de ablação por laser como a coagulação terapêutica, terapia tumoral intersticial e a fotocoagulação intersticial (GOUGH-PALMER *et al.*, 2008). Assim, nessa modalidade o laser atua como um “bisturi de luz” devido à maior potência, medida em Watts e ao maior comprimento de onda medido em nanômetros (nm) (CASTRO-E-

SILVA *et al.*, 2003). Já o LLLT interage com o tecido lesionado produzindo uma alteração no comportamento celular, que se manifesta bioquimicamente e fisiologicamente, sem liberação de calor ou com uma liberação térmica insignificante que varia menos que 0,1-0,5°C (CASTRO-E-SILVA *et al.*, 2003; HAWKINS, *et al.*, 2006; HU *et al.*, 2007). Há uma sensibilidade maior na interação do LLLT com o tecido lesionado do que com o tecido normal. Evidências demonstram que células e tecidos normais irradiados pela LLLT como cardiomiócitos e epiderme não sofrem alterações funcionais, sugerindo que a irradiação pelo laser não se apresenta prejudicial ao tecido sadio, não apresentando efeitos colaterais conhecidos (AD *et al.*, 2001; ORON *et al.*, 2001; HAWKINS *et al.*, 2006).

O LLLT pode estimular ou inibir a função celular dependendo dos parâmetros da dose. Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que, após a irradiação pelo laser com baixa dose há um efeito de estímulo em processos metabólicos específicos, mas em altas doses de irradiação o efeito é supressivo (SHAO *et al.*, 2005; HAWKINS, *et al.*, 2006; HOURELD *et al.*, 2008). Ao contrário dos efeitos estimuladores, que possuem parâmetros de luz já bem definidos, os inibidores não estão exatamente determinados (HOURELD *et al.*, 2008).

1.5.2 Mecanismos de ação do LLLT

Uma hipótese para explicar o mecanismo de bioestimulação é a absorção de energia irradiada pelos cromóforos intracelulares, constituintes da mitocôndria (IZZU, 2003; HU *et al.*, 2007). É na mitocôndria que ocorre a produção de energia, para o correto funcionamento celular, em forma de adenosina tri-fosfato (ATP). Quando é feita uma LLLT em um tecido ou célula lesionada a energia fotônica liberada é convertida em energia química ou metabólica na cadeia respiratória o que promove mudanças no

estado redox da mitocôndria e do citoplasma (HAWKINS, *et al.*, 2006; HU *et al.*, 2007). Baixas doses de LLLT também intensificam a formação de gradiente de prótons eletroquímicos na mitocôndria, que altera a bomba de cálcio celular e conseqüentemente libera cálcio pelo estímulo da Ca-ATPase da mitocôndria para o citoplasma. Esta maior disponibilidade de cálcio estimula a proliferação celular, aumento da liberação de citocinas e fatores de crescimento levando a alterações fisiológicas que afetam células como as endoteliais, mastócitos, macrófagos e fibroblastos (VLADIMIROV *et al.*, 2004; HAWKINS, *et al.*, 2006; HU *et al.*, 2007). Entretanto, em altas doses de LLLT muito cálcio é liberado o que causa hiperatividade da Ca-ATPase pelas bombas de cálcio, esgotando o ATP e inibindo o metabolismo celular (HAWKINS, *et al.*, 2006).

Percebe-se assim, que para um mesmo tipo celular a LLLT é capaz tanto de estimular quanto de inibir os processos metabólicos, demonstrando a dose dependência desses efeitos e por isso o termo mais adequado para demonstrar a interação do LLLT com o tecido biológico é biomodulação (HAWKINS *et al.*, 2007).

Logo, de acordo com os parâmetros da dose, a biomodulação pelo LLLT pode ser observada clinicamente através da ação antiinflamatória, pois leva à vasodilatação resultando na melhora da micro-circulação e maior suprimento sanguíneo para tecidos e órgãos (ORON *et al.*, 2001; VLADIMIROV *et al.*, 2004; RIZZI *et al.*, 2006). Mas antes do efeito antiinflamatório, percebido clinicamente, a LLLT possui efeito antioxidante, pois age na ativação de uma potente enzima antioxidante, a catalase reduzindo as EROs no tecido lesado o que conseqüentemente reduz a inflamação tecidual (ORON *et al.*, 2001; VLADIMIROV *et al.*, 2004).

1.5.3 Parâmetros da dose na LLLT

Os principais parâmetros da dose do LLLT de onda contínua são:

- ✓ tipo de laser,
- ✓ comprimento de onda medido em nm,
- ✓ potência medida em mW,
- ✓ densidade de potência medida em W/cm²,
- ✓ colimação do feixe de laser também denominada intensidade,
- ✓ tempo de exposição ao laser medido em segundos,
- ✓ método de aplicação por varredura ou pontual e
- ✓ energia ou fluência ou densidade de energia medida em J/cm² liberados para área de tratamento.

Estes parâmetros do LLLT são essenciais tanto para a estimulação quanto para a inibição do metabolismo celular (RATZ, 1995; HAWKINS *et al.*, 2005; HAWKINS, *et al.*, 2006) e se relacionam na fórmula $D \text{ (J/cm}^2\text{)} = P \text{ (W)} \times t \text{ (s)}/A \text{ (cm}^2\text{)}$ onde, D = densidade de energia, P = densidade de potência, t = tempo, A = área do “spot” do laser (RATZ, 1995).

1.5.3.1 Tipo de Laser

Qualquer tipo de laser possui basicamente o mesmo funcionamento dentro do equipamento, que é a inversão de população de elétrons após uma emissão estimulada e amplificação da luz pelo bombeamento. O que difere em cada um é a produção do comprimento de onda que será específico para cada meio ativo. Assim, um laser com meio ativo de rubi sempre produzirá luz com comprimento de onda 694 nm e o de ítrio,

alumínio e granada estabilizados pelo neodímio (Nd:YAG) de 1060nm. Os tipos de lasers, em relação ao meio ativo, permitirão maior ou menor absorção e penetração no tecido (RATZ, 1995; COLUZZI, 2004)

Já em relação ao tipo de onda emitida existem os de onda contínua, onde a potência é relativamente menor e não varia com o tempo, podendo ser aplicado por mais tempo no tecido. Já os de onda pulsada apresentam potência bem maior e a onda é interrompida por um período de tempo por um obturador mecânico. Este tipo de onda por possuir maior potência geralmente causa dano térmico ao tecido (RATZ, 1995; COLUZZI, 2004). (Figura 6).

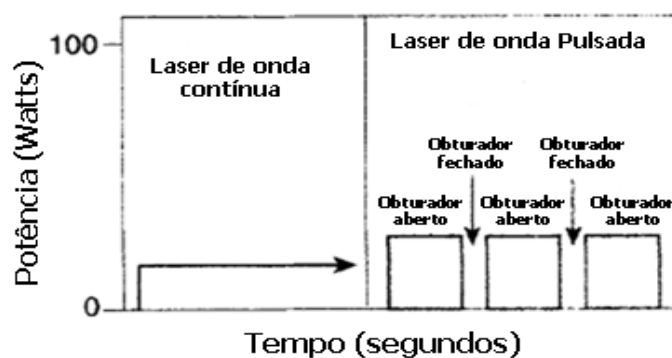


Figura 5. Tipo de laser em relação à onda emitida: laser de onda contínua com menor potência e laser de onda pulsada com maior potência. Adaptado de RATZ, 1995.

1.5.3.2 Comprimento de Onda

O comprimento de onda do laser é a distância mensurada entre duas cristas ou dois vales de uma onda sinusoidal. É representado pelo símbolo λ (lambda) e sua unidade de medida é o nanômetro (nm) que é o equivalente a 10^{-6} mm (RATZ, 1995).
Figura 7. Ele está relacionado com a profundidade de penetração tecidual, pois quanto

maior o λ maior a penetração, e varia de 500 a 1100 nm no LLLT (HOURELD *et al.*, 2008). Atualmente, a maioria dos efeitos terapêuticos do LLLT ocorre nas taxas espectrais de 442nm (no laser de hélio-cádmio – He-Cd laser), 632nm (hélio-neônio – He-Ne – ou laser de diodo), 780 – 803 – 808 – 904nm (laser de Diodo- GaAlAs) (ORON *et al.*, 2001; CASTRO-E-SILVA *et al.*, 2003; ORON *et al.*, 2006; RIZZI *et al.*, 2006).

Quanto menor o comprimento de onda, como o espectro em violeta ($\lambda = 410\text{nm}$), azul ($\lambda = 470\text{nm}$), verde ($\lambda = 512\text{nm}$) e amarelo ($\lambda = 590\text{nm}$) mais eficiente é a excitação molecular, mas a penetração tecidual é limitada. E quanto maior o comprimento de onda como o vermelho ($\lambda = 632\text{nm}$) e infravermelho (de $\lambda = 780\text{nm}$ ou mais) a excitação molecular é menor, mas a profundidade de penetração tecidual é maior, abrangendo um amplo volume do tecido. Sendo assim, para uma terapêutica num órgão, a melhor escolha é a que abrange a maior parte possível do volume deste, sendo um espectro maior a melhor escolha (CASTRO-E-SILVA *et al.*, 2003).

A absorção da energia do LLLT durante a interação com o tecido biológico não é totalmente definida. Sabe-se que o espectro de onda no infravermelho e vermelho possui maior profundidade de penetração apresentando alta absorção e bom efeito terapêutico em tecidos vivos, fornecendo os melhores resultados terapêuticos (HOURELD *et al.*, 2008).

Estudos *in vitro* avaliaram o exponencial de decaimento do LLLT, com meio ativo de argônio e com 599 nm, durante propagação em diferentes tipos de tecido em ratos. No tecido adiposo de ratos houve uma penetração de até 17 mm. Num modelo de gastrite crônica atrófica, também em ratos, a LLLT atenuou lesões estabelecidas mostrando que a aplicação externa da irradiação no estômago com o abdome fechado é possível (MELO *et al.*, 2001; SHAO *et al.*, 2005).

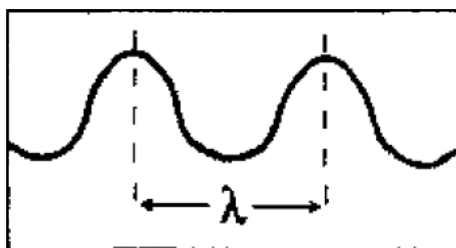


Figura 6. Esquema demonstrativo do comprimento de onda da luz laser. Adaptado de RATZ, 1995.

1.5.3.3 Densidade de energia ou fluência ou energia

A absorção da energia do LLLT pelo tecido por unidade de área é denominado densidade de energia ou fluência ou simplesmente energia. A unidade de medida designada para ela é Joules por cm^2 (J/cm^2). Considerando o processo de cicatrização do tecido conjuntivo, quanto menor a fluência, de 0,5 a 5 J/cm^2 , maior é o estímulo no processo de cicatrização e quando maior a fluência, acima de 10 J/cm^2 , ocorre uma diminuição na proliferação fibroblástica, o que ilustra a dependência dos resultados das terapias com LLLT em relação à fluência (CARRINHO *et al.*, 2006). Estudo *in vitro* confirma estes achados, quando demonstrou que o efeito cumulativo de baixas dose de fluência do LLLT (2,5 e 5 J/cm^2) levou a um efeito estimulatório dos fibroblastos e múltiplas exposições de altas doses (16 J/cm^2) resultou em efeito inibitório para proliferação de fibroblastos (HAWKINS, *et al.*, 2006).

1.5.3.4 **Tempo de duração**

O tempo de duração do efeito do LLLT pode ser incluído como um dos principais parâmetros quando se refere à dose de laser. Quanto maior o tempo de irradiação no tecido, maior a chance de dano térmico neste (RATZ, 1995). A interação do tempo de irradiação com o tecido é percebido pelo aumento de ATP celular observado imediatamente ou em até 1h após a irradiação. Outra resposta como proliferação celular requer pelo menos 24h para que o efeito possa ser observado (HAWKINS *et al.*, 2007). Já em cardiomiócitos submetidos à isquemia cardíaca a duração do efeito do LLLT permanece por longo tempo, cerca de 3 semanas após aplicação do laser (ORON *et al.*, 2001).

1.5.3.5 **Densidade de potência ou irradiância**

É a potência óptica útil do laser em Watts, dividida pela área irradiada em cm². Através do controle da irradiância pode-se inibir ou estimular atividades celulares. Bem como outros parâmetros do laser, a densidade de potência apresenta-se dose-dependente. Acima de 100 mW/cm² ela é capaz de inibir a atividade fibroblástica e a produção de fibras colágenas. (RATZ, 1995; BJORDAL *et al.*, 2008).

Para que o LLLT seja utilizado corretamente cada parâmetro da dose deve ser avaliado e ajustado para cada situação. Desta forma, o efeito terapêutico inicia-se a nível celular potencializando a respiração mitocondrial, aumentando a energia da célula devido ao aumento de ATP e ativação da Ca-ATPase. Então o efeito clínico apresenta-se primeiramente como antioxidante, pois atua diretamente na enzima catalase inibindo a produção de EROs e conseqüentemente antiinflamatório, pois leva à vasodilatação

melhorando o porte sanguíneo do tecido irradiado. Assim, devido a estas características possui extensas possibilidades terapêuticas. Consideramos que os efeitos da LLLT possa exercer papel promissor na redução da FI/AT renal da DRC, pois está é mediada por um mecanismo inflamatório crônico representado pelo fenômeno de TEM.

2 Objetivos

Geral

Avaliar o efeito do laser de baixa intensidade na fibrose, induzida no modelo de obstrução ureteral unilateral em ratos.

Específicos

1. Quantificar o percentual de fibrose no tecido renal antes e após da LILT e a expressão de colágeno tipo I;
2. Estudar a expressão de marcadores pró-fibróticos que atuam diretamente no fenômeno TEM (TGF- β 1, SMAD3) antes e após o laser;
3. Avaliar células que participam do processo fibrótico renal como fibroblastos e miofibroblastos (FSP-1, α -SMA) antes e após laserterapia.

3 Material e Método

3.1 Animais

O experimento utilizou 32 ratos Wistar, machos, com idade de aproximadamente 8 semanas e peso em torno de 250 a 300g, obtidos da colônia do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR-UFJF). Os animais foram mantidos com acesso regular à ração e água, sob um ciclo artificial claro/escuro de 12/12h a $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Juiz de Fora (nº 005/2008).

3.2 Modelo Experimental de Obstrução Ureteral Unilateral

Neste modelo os animais foram anestesiados com Ketamina 100mg/Kg i.p. (Vetanarcol[®], Konige, São Paulo, Brasil), i.p e Xilasina 10mg/Kg, (Anasedan[®], Vetbrands, Jacareí, Brasil). Com este esquema de drogas, o animal entrava em plano anestésico em cinco minutos e permanecia anestesiado por cerca de uma hora e vinte minutos. Com o animal anestesiado foi realizada a tricotomia abdominal com tricótomo (Oster[®], Tennessee, USA), as patas eram imobilizadas com fita adesiva (3M, Campinas, Brasil) em decúbito dorsal no leito cirúrgico. Após anti-sepsia do abdome com álcool iodado a 2%. Com o rato em decúbito dorsal realizava-se a laparotomia ventral mediana com exposição das vísceras abdominais. Em seguida, essas eram rebatidas para o tórax, protegidas com compressa de gaze umedecida em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% (Basafarma, Porto Alegre, Brasil). O rim e ureter esquerdos eram visualizados sob visão direta com auxílio de foco cirúrgico (KSS Comércio Indústria de Equipamentos Médicos LTDA, Curitiba, Brasil) e então foi feita a ligadura do ureter

esquerdo, com duas suturas com fio de seda 4.0 (TECNHOFIO[®], Indústria Comércio LTDA, Goiânia, Brasil), uma proximal e outra distal ao rim e, entre as suturas, o ureter foi seccionado garantindo, assim, a obstrução. O rim, contra-lateral, não foi manipulado.

Logo em seguida, as vísceras foram deslocadas de volta à cavidade abdominal e procedeu-se à sutura contínua com fio de seda 4.0 (TECNHOFIO[®], Indústria Comércio LTDA, Goiás, Brasil) da parede abdominal e posteriormente da pele. Os animais foram mantidos em observação até a completa recuperação da anestesia e do procedimento cirúrgico. Acondicionamos dois animais por gaiola devido à realização do procedimento cirúrgico e ao tamanho dos animais. Os animais foram mantidos sob os cuidados do biotério até a realização da eutanásia que foi feita no 14º dia após OUU ou manipulação do ureter ou da primeira dose do laser.

Antes da eutanásia, que foi feita por exanguinação sob anestesia, foi coletado sangue através de punção cardíaca. Os rim esquerdo foi coletado para análises morfológica, imunohistoquímica e PCR-RT. Na anestesia para eutanásia foram utilizadas as mesmas drogas e doses supracitadas para o procedimento cirúrgico.

3.3 Laser de Baixa Intensidade

O equipamento de LLLT utilizado foi o Twin laser (MM Optics[®], São Carlos, Brasil). O Laser aplicado foi de meio ativo de diodo AsGaAl no comprimento de onda infravermelho de 780nm. Os parâmetros da dose foram: onda contínua, 22,5J/cm² de densidade de energia; 30mW de potência, por 30s, diâmetro do “spot” laser de 4 mm². A técnica de aplicação utilizada foi a pontual e administrado em nove locais distintos da superfície anterior do rim esquerdo, intra-operatória, como será especificado no protocolo no item 3.4 (ORON *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

3.4 Protocolo Experimental

Para os objetivos descritos, os animais foram randomicamente divididos em quatro grupos:

Grupo 1 - Cirurgia Controle (n = 8)

Os ratos foram submetidos ao procedimento de laparotomia mediana, mas o ureter esquerdo não foi obstruído, sendo apenas manipulado. Neste grupo não foi realizado o tratamento com LLLT. A eutanásia foi feita no 14º dia após a cirurgia.

Grupo 2 - Obstrução Ureteral Unilateral – OUU (n = 8)

Os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos do grupo acima, mas o ureter esquerdo foi submetido a duas ligaduras no terço médio, uma distal e outra proximal e foi realizada secção entre as duas. Este grupo não foi tratado com laserterapia e a eutanásia realizada no 14º dia após OUU.

Grupo Obstrução 3 - Ureteral Unilateral + 1 dose intra-operatória de laser – OUU + L1 dose (n = 8)

Neste grupo após a obstrução ureteral unilateral esquerda realizada conforme descrito anteriormente, o LLLT foi aplicado intra-cirúrgico no rim esquerdo, em nove pontos, com objetivo de cobrir toda superfície anterior do rim, após quinze minutos da obstrução ureteral. A eutanásia foi feita após 14 dias.

Grupo 4 - cirurgia controle + 1 dose intra-operatória de laser – L1 (n = 8)

Este grupo foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico descrito no primeiro grupo. Após 15 minutos da manipulação do ureter (sem obstrução), foi aplicada a dose intra-cirúrgica da LLLT como descrito para o grupo 3. A eutanásia foi feita no 14º dia.

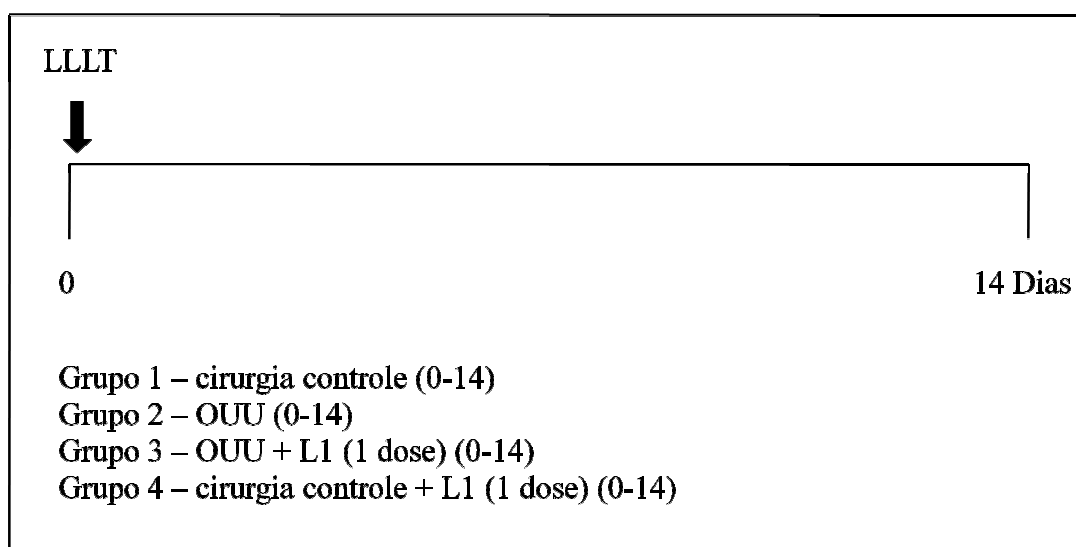


Figura 7: Esquema do protocolo experimental para os grupos 1, 2, 3 e 4.

3.5 Parâmetros Avaliados

3.5.1 Peso Corporal

A avaliação da alteração do peso corporal foi realizada registrando-se o peso, em gramas, de cada animal no dia da cirurgia e no dia da eutanásia, e os resultados expressos em percentagem de perda ou incremento.

3.5.2 Fibrose Renal

3.5.2.1 Preparo do material

No 14º dia os rins foram retirados em condições assépticas, porém não estéreis, com os animais sob efeito anestésico. Após seccionada a cápsula renal com lâmina de bisturi nº 15 (LAMEDID Ltda, Barueri, Brasil), o rim esquerdo foi cortado sagitalmente em dois fragmentos aproximadamente simétricos. Uma metade deste fragmento foi fixada em formol tamponado a 10% até a montagem em blocos de parafina para coloração por picrossírius (F3BA CI 35782, Sigma, St. Louis, EUA) 0,1% em solução saturada de ácido pícrico saturado (Sigma, St. Louis, EUA) por 60 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em ácido acético glacial 2x5 minutos e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Sigma, St. Louis, EUA). A outra metade do fragmento foi fixada por 24h pela solução de metil-Carnoy, solução formada pela mistura de álcool absoluto, clorofórmio e ácido acético glacial, na proporção de 6:3:1 (v/v) respectivamente, e posteriormente em metanol a 70% para montagem em blocos de parafina e análise de imunohistoquímica. Todos os blocos em parafina foram processados de forma rotineira em laboratório até a coloração. Um pequeno fragmento foi retirado do córtex renal e acondicionado em solução de RNA later[®] (Qiagen, Ambion Inc., Austin, USA) a temperatura ambiente, em seguida armazenado a -80º e submetido a análise de RNAm.

3.5.2.2 Análise histomorfométrica

A análise da fibrose renal foi realizada por único observador treinado, que não tinha acesso à identificação das lâminas. As imagens utilizadas foram inicialmente capturadas em microscopia de campo claro e em seguida a mesma área foi capturada em campo escuro, com aumento de 200x. Foi utilizado microscópio AxioPhot I, equipado com câmera AxioCam ICc3 e software de captura e digitalização de imagens AxioVision v 4.7.2.0 (Carl Zeiss, Goettingen, Germany). Sob campo claro, as áreas coradas de cor avermelhada abrangiam áreas de componentes da MEC no compartimento túbulo-intersticial, o ponto de interesse do estudo, como também glomérulos, adventícias de vasos sanguíneos e região medular. No campo claro a área ocupada por componentes da MEC é visualizada em cor rosa/avermelhado, incluindo os colágenos I e III. Os mesmos campos foram submetidos à microscopia de campo escuro, sob luz polarizada onde, dos componentes da MEC corados pelo picrossírius, apenas o colágeno tipo I e III aparecem com aspecto luminoso, por serem birrefringentes. O campo escuro foi duplicado e transformado em campo de leitura, onde foi realizada análise automática pelo programa software Image J 1.43a, 64-bit (National Institutes of Health, Bethesda, USA; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). As áreas de aspecto luminoso birrefringentes foram contabilizadas pelo programa como percentagem da área total do campo avaliado (GRIMM *et al.*, 2003; CORREA-COSTA *et al.*, 2010). Foram avaliados 10 campos do córtex renal, não sobrepostos, em cada lâmina, no aumento de 200x, com área do campo de 0,09mm², cinco animais por grupo. Para o resultado final foi feita a média aritmética dos 10 campos analisados por lâmina, expressos em percentagem da área total do campo avaliado. O resultado representa, portanto, a área, localizada no interstício do córtex renal, ocupada por colágeno I e III.

As áreas coradas pelo picrossírius em glomérulos, adventícia de vasos e região medular foram excluídas.

3.5.3 Identificação de células relacionadas a TEM – miofibroblastos e miofibroblastos

Foram realizadas análises por imunohistoquímica para duas proteínas, α -SMA e FSP-1, que identificam miofibroblastos e fibroblastos respectivamente e, portanto, sinalizam o fenômeno de TEM. A presença dessas proteínas aponta para fibrose em curso ou estabelecida (LIU, 2004).

A localização de α -SMA na titulação de 1:300 (Abcam, Cambrigde, UK) e FSP-1 na titulação de 1:600 (A5114, DAKO, Ely, Reino Unido) foi avaliada em cortes de tecido incluído em parafina. As lâminas foram desparafinizadas, reidratadas e submetidas a uma solução Tris-EDTA (pH 9) a 95 ° C para a recuperação antigênica. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3%, e adicionalmente com uma solução bloqueadora de proteína (DAKO, USA). As lâminas foram incubadas com um anticorpo primário ou reagente controle negativo, seguido de incubação com o polímero marcado (DAKO, USA) utilizando duas incubações seqüenciais de 30 minutos em temperatura ambiente. A coloração foi completada por um minuto de incubação com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) + substrato cromógeno, que cora o antígeno específico de marrom, seguida pela contra-coloração pela hematoxilina (SEMEDO *et al.*, 2009).

A quantificação da expressão de α -SMA e FSP-1 foi realizada sob microscopia com campo claro com objetivas em uma ampliação de 20 e 40x respectivamente, com auxílio de microscópio Axiophot I equipado com câmera AxioCam ICc3 e software

AxioVision 4.7.2.0 (Carl Zeiss, Goettingen, Alemanha), para captura e digitalização das imagens.

Para α -SMA, foram analisados 20 campos, que não se sobrepunham. A porcentagem da área corada foi analisada usando um macro automatizado especialmente escrito para o pacote de software ImageJ 1.43a, 64 bits (OLIVEIRA, 2010) (National Institutes of Health, Bethesda, EUA; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) (CORREA-COSTA *et al.*, 2010). Os resultados foram expressos em porcentagem de área positiva para α -SMA em relação à área total do campo avaliado. Os vasos, glomérulos, córtex subcapsular e medula foram evitados durante processo aquisição das imagens.

Células positivas para FSP-1 foram contadas, também em 20 campos, de 400x, manualmente, usando o mesmo software. Os resultados foram expressos em número de células positivas por campo avaliado.

3.5.4 Genes pró-fibróticos

A identificação dos genes pró-fibróticos colágeno I, TGF- β e sua proteína sinalizadora Smad3 foi feita através da quantificação do mRNA por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

Os “primers” utilizados foram: Colágeno tipo I (sense) 5'-TGG CCA AGA AGA CAT CCC TGA AGT-3', (antisense) 5'-AGA TCA GGT TTC CAC GTC TCA CCA-3'; TGF- β (sense) 5'-TCA GTC CCA AAC GTC GAG GT-3', (antisense) 5'-GCT GTG CAG GTG TTG AGC C-3' e Smad3 (sense)AGG AAT TTG GTG CCC TCC TAG, (antisense) GCC TTT GAC GAA GCT CAT GC (CORREA-COSTA *et al.*, 2010). A reação de RT-PCR foi realizada por meio do termociclador ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Todas as reações foram otimizadas para cada

par de “primers”, testando a temperatura de anelamento e o número de ciclos adequados. A especificidade da reação foi confirmada por análise da curva de fusão dos produtos e eletroforese em gel de agarose.

Para o ensaio Sybergreen, a amplificação foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 1 µL de cDNA a uma concentração de 2 ng/µL, 0,5 µL de cada “primer” (100 pmol/ µL), 5,0 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) e 3 µL de água destilada estéril. A termociclagem seguiu o seguinte programa: 10 minutos a 95°C seguidos de 45 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C. Para o ensaio TaqMan, a amplificação foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 1 µL de cDNA a uma concentração de 2 ng/µL, 0,5 µL de cada sonda 20x *TaqMan*[®] *Gene Expression Assay*, 5 µL de 2x *TaqMan*[®] *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, USA) e 3,5 µL de água destilada estéril. A termociclagem seguiu o seguinte programa: 2 minutos a 50°C, seguidos de 10 minutos a 95°C e de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Em todas as reações de PCR, foram amplificadas uma amostra de água em substituição ao cDNA, servindo como controle negativo para exclusão de contaminação exógena.

A análise dos resultados foi feita pelo programa *Sequence Detection Software 1.9* (SDS, CA, USA) A expressão do mRNA foi normalizada pela abundância do HPRT (gene controle). Subseqüentemente, todos os resultados foram expressos em relação à expressão dos respectivos animais controles. Uma relação comparativa ente os ciclos da reação (CT) foi usada para determinar a expressão gênica, em relação ao gene controle HPRT. Dessa maneira, níveis arbitrários de mRNA foram expressos com uma diferença de “n” vezes em relação ao calibrador. O valor usado para demonstrar a expressão relativa desses genes foi calculado pela equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (*).

*K. Livak – PE – Applied Biosystems; Sequence Detector user Bulletin 2

3.6 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados com média \pm erro padrão. Quando as variáveis foram paramétricas foi aplicado o teste *t Student* e para variáveis não paramétricas o Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de *p* foi menor que 0,05. O programa utilizado para realização da análise foi o SigmaStat[®] (Version 13 Systat Software Inc., Chicago, USA).

4 Resultados

Low level laser therapy decreases renal interstitial fibrosis

Oliveira, Fabiana A. M; Moraes, Ana Carolina M; Paiva, Amanda P; Schinzel, Vânia; Costa, Matheus C; Semedo, Patricia; Cenedeze, Marcos Antonio; Oliveira, Roberto Sotó-Maior Fortes; Bastos, Marcus Gomes; Câmara, Niels Olsen Saraiva; Pinheiro, Helady Sanders.

Abstract

Background and Objective: Regardless of the etiology, chronic kidney disease (CKD) involves progressive widespread tissue fibrosis, tubular atrophy and loss of kidney function. At present, effective therapies to this condition are lacking. We investigated the effects of low level laser therapy (LLLT) on the interstitial fibrosis and tubular atrophy that occurs after unilateral ureteral obstruction (UUO) in rats, an experimental model of CKD.

Study Design/Materials and Methods: The occluded kidney of half of the third two Wistar rats that underwent UUO received a single intraoperative dose of LLLT (AlGaAs laser, 780 nm, 22.5 J/cm², 30 mW, 30 seconds on each of nine points). After 14 days, renal fibrosis was assessed by Sirius red staining and measurement of the cross-sectional area under polarized light. Immunohistochemical analyses quantitated the renal tissue cells that expressed fibroblast (FSP-1) and myofibroblast (α -SMA) markers. RT-PCR was performed to determine the mRNA expression of key fibrosis-related genes, namely TGF- β 1, Smad3 and collagen I (Col I).

Results: The UUO and LLLT animals had less severe renal fibrosis than OUU animals. α -SMA, TGF- β 1 and Smad3 were increased in the renal interstitium of UUO rats.

LLLT reduced the expression of all of these molecules. LLLT did not appear to have a significant effect on Col I or FSP-1, which were also induced by UUO.

Conclusion: For the first time, we showed LLLT had a protective effect regarding renal interstitial fibrosis. It is conceivable that by attenuating inflammation, LLLT can prevent tubular activation and transdifferentiation, which are the two processes that mainly drive the renal fibrosis of the UUO model.

Keywords: low-level laser therapy, ureteral obstruction; renal fibrosis; chronic kidney failure; transforming growth factor beta; smad proteins; alfa-smooth muscle actin.

Submissão do artigo no periódico Lasers in Surgery and Medicine

Preview

From: lsm@manuscriptmgt.com

To: fabsmay@hotmail.com

CC:

Subject: Lasers in Surgery & Medicine - Manuscript LSM-11-0027

Body: @@date to be populated upon sending@@

Manuscript number: LSM-11-0027

Dear Mrs. Oliveira:

Thank you for submitting your manuscript entitled Low level laser therapy decreases renal interstitial fibrosis by Oliveira, Fabiana; Moraes, Ana Carolina; Paiva, Amanda; Schinzel, Vânia; Correa-Costa, Matheus; Semedo, Patricia; Cenedeze, Marcos Antonio; Oliveira, Roberto; Bastos, Marcus; Câmara, Niels; Pinheiro, Helady. We will be passing it on to the editors for evaluation shortly. Please note, however, that if the format or any part of your paper to include text; abstract and/or references or figures are not styled according to our author instructions we will not be able to process your submission. In such case, we will contact you and we will unsubmit your paper back to you for proper formatting and re-submission.

To track the progress of your manuscript through the editorial process using our new web-based system, simply point your browser to:

<http://mc.manuscriptcentral.com/lsm>

and log in using the following user ID and password:

(User ID): fabsmay@hotmail.com

(Password): @@PASSWORD18115261@@

May we also kindly ask you to always include the manuscript ID number LSM-11-0027 in any future correspondence regarding this article.

If you experience problems associated with the submission web site, please click on the "Get Help Now" link at <http://mc.manuscriptcentral.com/lsm>

The American Society for Laser Medicine and Surgery (ASLMS) is the world's largest professional organization dedicated to promoting excellence in patient care by advancing laser applications and related technologies. Membership includes physicians and surgeons representing more than 51 medical specialties, nurses and other allied health care professionals, physicists involved with product development, biomedical engineers, biologists and equipment manufacturers. If you are not already a member, we encourage you to visit our Web site at www.aslms.org, view the many benefits of membership and join today!

Each year we conduct an annual scientific conference for the multidisciplinary exchange of information on the latest discoveries, applications and research involving medical lasers. The next ASLMS Annual Conference will be March 30 – April 3, 2011 at the Gaylord Texan Resort & Convention Center in Grapevine, Texas.

A reminder that the next application deadline to join the ASLMS is March 28, 2011. Please join today!

Diane Dodds
Member and Customer Service Assistant
American Society for Laser Medicine and Surgery, Inc.
2100 Stewart Avenue, Suite 240
Wausau, WI 54401
Tel: (715) 845-9283
Fax: (715) 848-2493
www.aslms.org

Not an ASLMS Member? Join Today!

Our Mission: The American Society for Laser Medicine and Surgery promotes excellence in patient care by advancing biomedical application of lasers and other related technologies worldwide.

ASLMS 31st Annual Conference
Pre-Conference Courses March 30 - 31, 2011
Conference April 1 - 3, 2011
Gaylord Texan Resort & Convention Center
Grapevine, TX

J. Stuart Nelson
Lasers in Surgery & Medicine Editor-in-Chief

Date Sent: 06-Feb-2011

5 CONCLUSÃO

Com base nos dados apresentados, podemos concluir que o LLLT é capaz de proteger o rim do desenvolvimento da fibrose túbulo-intersticial, induzida no modelo de obstrução ureteral unilateral em ratos.

De maneira específica, podemos concluir que o LLLT:

- Reduz área fibrótica, como visto na quantificação de fibrose intersticial pelo picrosírius;

- Diminui a expressão de RNAm de moléculas pró-fibróticas que atuam diretamente no fenômeno TEM como TGF- β 1 e Smad3, bem como nos miofibroblastos, expressos por α -SMA.

6 Referências

ABBATE, M. *et al.* Proximal tubular cells promote fibrogenesis by TGF-beta1-mediated induction of peritubular myofibroblasts. *Kidney Int* [S.I.], v. 61, n. 6, p. 2066-77, Jun 2002.

AD, N.; ORON, U. Impact of low level laser irradiation on infarct size in the rat following myocardial infarction. *Int J Cardiol* [S.I.], v. 80, n. 2-3, p. 109-16, Sep-Oct 2001.

ALPERS, C. E. *et al.* Enhanced expression of "muscle-specific" actin in glomerulonephritis. *Kidney Int* [S.I.], v. 41, n. 5, p. 1134-42, May 1992.

ARESU, L. *et al.* Dog as model for down-expression of E-cadherin and beta-catenin in tubular epithelial cells in renal fibrosis. *Virchows Arch* [S.I.], v. 453, n. 6, p. 617-25, Dec 2008.

BANI-HANI, A. H. *et al.* Cytokines in epithelial-mesenchymal transition: a new insight into obstructive nephropathy. *J Urol* [S.I.], v. 180, n. 2, p. 461-8, Aug 2008.

BARSOUM, R. S. Chronic kidney disease in the developing world. *N Engl J Med* [S.I.], v. 354, n. 10, p. 997-9, Mar 9 2006.

BEDI, S. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition and chronic allograft tubulointerstitial fibrosis. *Transplant Rev (Orlando)* [S.I.], v. 22, n. 1, p. 1-5, Jan 2008.

BJORDAL, J. M. *et al.* A systematic review with procedural assessments and meta-analysis of low level laser therapy in lateral elbow tendinopathy (tennis elbow). *BMC Musculoskelet Disord* [S.I.], v. 9, p. 75, 2008.

BOFFA, J. J. *et al.* Regression of renal vascular and glomerular fibrosis: role of angiotensin II receptor antagonism and matrix metalloproteinases. *J Am Soc Nephrol* [S.I.], v. 14, n. 5, p. 1132-44, May 2003.

BOIXEDA, P. *et al.* [Recent advances in laser therapy and other technologies]. *Actas Dermosifiliogr* [S.I.], v. 99, n. 4, p. 262-8, May 2008.

BONEGIO, R. G. *et al.* Rapamycin ameliorates proteinuria-associated tubulointerstitial inflammation and fibrosis in experimental membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* [S.I.], v. 16, n. 7, p. 2063-72, Jul 2005.

CARRINHO, P. M. *et al.* Comparative study using 685-nm and 830-nm lasers in the tissue repair of tenotomized tendons in the mouse. *Photomed Laser Surg* [S.I.], v. 24, n. 6, p. 754-8, Dec 2006.

CASTRO-E-SILVA, O., JR. *et al.* Spectral response for laser enhancement in hepatic regeneration for hepatectomized rats. *Lasers Surg Med* [S.I.], v. 32, n. 1, p. 50-3, 2003.

CORREA-COSTA, M. *et al.* Induction of heme oxygenase-1 can halt and even reverse renal tubule-interstitial fibrosis. *PLoS One* [S.I.], v. 5, n. 12, p. e14298.

CHEVALIER, R. L. Chronic partial ureteral obstruction and the developing kidney. *Pediatr Radiol* [S.I.], v. 38 Suppl 1, p. S35-40, Jan 2008.

COLUZZI, D. J. Fundamentals of dental lasers: science and instruments. *Dent Clin North Am* [S.I.], v. 48, n. 4, p. 751-70, v, Oct 2004.

CORNELL, L. D.; COLVIN, R. B. Chronic allograft nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* [S.I.], v. 14, n. 3, p. 229-34, May 2005.

DIAMOND, J. R. Macrophages and progressive renal disease in experimental hydronephrosis. *Am J Kidney Dis* [S.I.], v. 26, n. 1, p. 133-40, Jul 1995.

DOCHERTY, N. G. *et al.* Evidence that inhibition of tubular cell apoptosis protects against renal damage and development of fibrosis following ureteric obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* [S.I.], v. 290, n. 1, p. F4-13, Jan 2006.

EDDY, A. A. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* [S.I.], v. 7, n. 12, p. 2495-508, Dec 1996.

EDDY, A. A. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* [S.I.], v. 15, n. 3-4, p. 290-301, Dec 2000.

ERICKSON, A. C.; COUCHMAN, J. R. Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem* [S.I.], v. 48, n. 10, p. 1291-306, Oct 2000.

ESSAWY, M. *et al.* Myofibroblasts and the progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* [S.I.], v. 12, n. 1, p. 43-50, Jan 1997.

FILLIPIN, L. I. *et al.* Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers Surg Med* [S.I.], v. 37, n. 4, p. 293-300, Oct 2005.

GERSCHMAN, R. *et al.* Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* [S.I.], v. 119, n. 3097, p. 623-6, May 7 1954.

GOUGH-PALMER, A. L.; GEDROYC, W. M. Laser ablation of hepatocellular carcinoma-A review. *World J Gastroenterol* [S.I.], v. 14, n. 47, p. 7170-4, Dec 21 2008.

GRIMM, P. C. *et al.* Computerized image analysis of Sirius Red-stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function. *J Am Soc Nephrol* [S.I.], v. 14, n. 6, p. 1662-8, Jun 2003.

GROSS, O. *et al.* Antifibrotic, nephroprotective potential of ACE inhibitor vs AT1 antagonist in a murine model of renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* [S.I.], v. 19, n. 7, p. 1716-23, Jul 2004.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* [S.I.], v. 102 Suppl 10, p. 5-12, Dec 1994.

HALLORAN, P. F. *et al.* Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J Am Soc Nephrol* [S.I.], v. 10, n. 1, p. 167-81, Jan 1999.

HATINI, V. *et al.* Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes Dev* [S.I.], v. 10, n. 12, p. 1467-78, Jun 15 1996.

HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg* [S.I.], v. 23, n. 3, p. 251-9, Jun 2005.

HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg* [S.I.], v. 24, n. 6, p. 705-14, Dec 2006.

HAWKINS, D. H.; ABRAHAMSE, H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers Surg Med* [S.I.], v. 38, n. 1, p. 74-83, Jan 2006.

HAWKINS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Time-dependent responses of wounded human skin fibroblasts following phototherapy. *J Photochem Photobiol B* [S.I.], v. 88, n. 2-3, p. 147-55, Sep 25 2007.

HAY, E. D.; ZUK, A. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am J Kidney Dis* [S.I.], v. 26, n. 4, p. 678-90, Oct 1995.

HERZLINGER, D. Renal interstitial fibrosis: remembrance of things past? *J Clin Invest* [S.I.], v. 110, n. 3, p. 305-6, Aug 2002.

HOGAN, B. L. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* [S.I.], v. 6, n. 4, p. 432-8, Aug 1996.

HORSTER, M. F. *et al.* Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. *Physiol Rev* [S.I.], v. 79, n. 4, p. 1157-91, Oct 1999.

HOURELD, N. N.; ABRAHAMSE, H. Laser light influences cellular viability and proliferation in diabetic-wounded fibroblast cells in a dose- and wavelength-dependent manner. *Lasers Med Sci* [S.I.], v. 23, n. 1, p. 11-8, Jan 2008.

HU, W. P. *et al.* Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. *J Invest Dermatol* [S.I.], v. 127, n. 8, p. 2048-57, Aug 2007.

ITO, K. *et al.* Renal damage progresses despite improvement of renal function after relief of unilateral ureteral obstruction in adult rats. *Am J Physiol Renal Physiol* [S.I.], v. 287, n. 6, p. F1283-93, Dec 2004.

IWANO, M. *et al.* Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* [S.I.], v. 110, n. 3, p. 341-50, Aug 2002.

IZZO, F. Other thermal ablation techniques: microwave and interstitial laser ablation of liver tumors. *Ann Surg Oncol* [S.I.], v. 10, n. 5, p. 491-7, Jun 2003.

JINDE, K. *et al.* Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* [S.I.], v. 38, n. 4, p. 761-9, Oct 2001.

JOHNSON, R. J. *et al.* Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. Alpha-smooth muscle actin is a marker of mesangial cell proliferation. *J Clin Invest* [S.I.], v. 87, n. 3, p. 847-58, Mar 1991.

K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* [S.I.], v. 39, n. 2 Suppl 1, p. S1-266, Feb 2002.

KALLURI, R.; NEILSON, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* [S.I.], v. 112, n. 12, p. 1776-84, Dec 2003.

KANETO, H. *et al.* Increased expression of TGF-beta1 but not of its receptors contributes to human obstructive nephropathy. *Kidney Int* [S.I.], v. 56, n. 6, p. 2137-46, Dec 1999.

KAPLAN, B.; MEIER-KRIESCHE, H. U. Death after graft loss: an important late study endpoint in kidney transplantation. *Am J Transplant* [S.I.], v. 2, n. 10, p. 970-4, Nov 2002.

KAWAMOTO, H. *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 plays important roles in the kidney following unilateral ureteral obstruction. *Hypertens Res* [S.I.], v. 29, n. 4, p. 285-94, Apr 2006.

KISSELEVA, T.; BRENNER, D. A. Fibrogenesis of parenchymal organs. *Proc Am Thorac Soc* [S.I.], v. 5, n. 3, p. 338-42, Apr 15 2008.

KLAHR, S. New insights into the consequences and mechanisms of renal impairment in obstructive nephropathy. *Am J Kidney Dis* [S.I.], v. 18, n. 6, p. 689-99, Dec 1991.

KLAHR, S.; MORRISSEY, J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* [S.I.], v. 283, n. 5, p. F861-75, Nov 2002.

KLAHR, S.; MORRISSEY, J. Progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* [S.I.], v. 41, n. 3 Suppl 1, p. S3-7, Mar 2003.

KRAMER, S. *et al.* Mycophenolate mofetil slows progression in anti-thy1-induced chronic renal fibrosis but is not additive to a high dose of enalapril. *Am J Physiol Renal Physiol* [S.I.], v. 289, n. 2, p. F359-68, Aug 2005.

LANGE-SPERANDIO, B. *et al.* Selectins mediate macrophage infiltration in obstructive nephropathy in newborn mice. *Kidney Int* [S.I.], v. 61, n. 2, p. 516-24, Feb 2002.

LEVEY, A. S. *et al.* Chronic kidney disease: common, harmful, and treatable--World Kidney Day 2007. *J Am Soc Nephrol* [S.I.], v. 18, n. 2, p. 374-8, Feb 2007.

LEVEY, A. S. *et al.* National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* [S.I.], v. 139, n. 2, p. 137-47, Jul 15 2003.

LI, M. X.; LIU, B. C. Epithelial to mesenchymal transition in the progression of tubulointerstitial fibrosis. *Chin Med J (Engl)* [S.I.], v. 120, n. 21, p. 1925-30, Nov 5 2007.

LI, Y. *et al.* Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *J Clin Invest* [S.I.], v. 112, n. 4, p. 503-16, Aug 2003.

LIRANI, A. P.; LAZARETTI-CASTRO, M. [Evidences of physical agents action on bone metabolism and their potential clinical use]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* [S.I.], v. 49, n. 6, p. 891-6, Dec 2005.

LIU, Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* [S.I.], v. 15, n. 1, p. 1-12, Jan 2004.

MAESHIMA, A. *et al.* Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol* [S.I.], v. 14, n. 12, p. 3138-46, Dec 2003.

MASSZI, A. *et al.* Integrity of cell-cell contacts is a critical regulator of TGF-beta 1-induced epithelial-to-myofibroblast transition: role for beta-catenin. *Am J Pathol* [S.I.], v. 165, n. 6, p. 1955-67, Dec 2004.

MATSUI, K. *et al.* Lymphatic microvessels in the rat remnant kidney model of renal fibrosis: aminopeptidase p and podoplanin are discriminatory markers for endothelial

cells of blood and lymphatic vessels. *J Am Soc Nephrol* [S.I.], v. 14, n. 8, p. 1981-9, Aug 2003.

MELO, C. A. *et al.* Characterization of light penetration in rat tissues. *J Clin Laser Med Surg* [S.I.], v. 19, n. 4, p. 175-9, Aug 2001.

MEZZANO, S. A. *et al.* Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* [S.I.], v. 38, n. 3 Pt 2, p. 635-8, Sep 2001.

MICHLI, E. *et al.* Atorvastatin preserves renal function in chronic complete unilateral ureteral obstruction. *J Urol* [S.I.], v. 177, n. 2, p. 781-5, Feb 2007.

MIZUGUCHI, Y. *et al.* Atorvastatin ameliorates renal tissue damage in unilateral ureteral obstruction. *J Urol* [S.I.], v. 172, n. 6 Pt 1, p. 2456-9, Dec 2004.

MOODY, T. E. *et al.* Relationship between renal blood flow and ureteral pressure during 18 hours of total unilateral urethral occlusion. Implications for changing sites of increased renal resistance. *Invest Urol* [S.I.], v. 13, n. 3, p. 246-51, Nov 1975.

MULLER, G. A. *et al.* The role of interstitial cells in the progression of renal diseases. *J Am Soc Nephrol* [S.I.], v. 2, n. 10 Suppl, p. S198-205, Apr 1992.

NAKATSUJI, S. *et al.* Macrophages, myofibroblasts, and extracellular matrix accumulation in interstitial fibrosis of chronic progressive nephropathy in aged rats. *Vet Pathol* [S.I.], v. 35, n. 5, p. 352-60, Sep 1998.

NANKIVELL, B. J. *et al.* The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* [S.I.], v. 349, n. 24, p. 2326-33, Dec 11 2003.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* [S.I.], v. 79, n. 2, p. 319-26, Feb 1987.

NG, Y. Y. *et al.* Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int* [S.I.], v. 54, n. 3, p. 864-76, Sep 1998.

NUSSBAUM, E. L. Low-intensity laser therapy for benign fibrotic lumps in the breast following reduction mammoplasty. *Phys Ther* [S.I.], v. 79, n. 7, p. 691-8, Jul 1999.

OLIVEIRA, A. F. *et al.* The effect of laser on remanent liver tissue after 90% hepatectomy in rats. *Acta Cir Bras* [S.I.], v. 21 Suppl 1, p. 29-32, 2006.

OLIVER, J. A. Unexpected news in renal fibrosis. *J Clin Invest* [S.I.], v. 110, n. 12, p. 1763-4, Dec 2002.

OLIVEIRA, R. S.-M. F.; OLIVEIRA, F.A.M.; PINHEIRO, H.S. Programando o software imagej para a seleção automática de áreas marcadas por imuno-histoquímica e coradas com o cromógeno DAB e contra-coradas pela hematoxilina. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 2, n. 3, p. in press, 2010.

ORON, A. *et al.* Low-level laser therapy applied transcranially to rats after induction of stroke significantly reduces long-term neurological deficits. *Stroke* [S.I.], v. 37, n. 10, p. 2620-4, Oct 2006.

ORON, U. *et al.* Low-energy laser irradiation reduces formation of scar tissue after myocardial infarction in rats and dogs. *Circulation* [S.I.], v. 103, n. 2, p. 296-301, Jan 16 2001.

PARK, S. H. *et al.* Erythropoietin decreases renal fibrosis in mice with ureteral obstruction: role of inhibiting TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* [S.I.], v. 18, n. 5, p. 1497-507, May 2007.

PASCUAL, M. *et al.* Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* [S.I.], v. 346, n. 8, p. 580-90, Feb 21 2002.

PICARD, N. *et al.* Origin of renal myofibroblasts in the model of unilateral ureter obstruction in the rat. *Histochem Cell Biol* [S.I.], v. 130, n. 1, p. 141-55, Jul 2008.

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* [S.I.], v. 276, n. 5309, p. 71-4, Apr 4 1997.

QI, W. *et al.* The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* [S.I.], v. 38, n. 1, p. 1-5, Jan 2006.

RASTALDI, M. P. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int* [S.I.], v. 62, n. 1, p. 137-46, Jul 2002.

RATZ, J. L. Laser physics. *Clin Dermatol* [S.I.], v. 13, n. 1, p. 11-20, Jan-Feb 1995.

REMUZZI, G. *et al.* Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* [S.I.], v. 116, n. 2, p. 288-96, Feb 2006.

REMUZZI, G.; BERTANI, T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* [S.I.], v. 339, n. 20, p. 1448-56, Nov 12 1998.

RIZZI, C. F. *et al.* Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med* [S.I.], v. 38, n. 7, p. 704-13, Aug 2006.

ROBERTS, I. S. *et al.* Interstitial myofibroblasts: predictors of progression in membranous nephropathy. *J Clin Pathol* [S.I.], v. 50, n. 2, p. 123-7, Feb 1997.

RODRIGUEZ-PENA, A. *et al.* Endoglin upregulation during experimental renal interstitial fibrosis in mice. *Hypertension* [S.I.], v. 40, n. 5, p. 713-20, Nov 2002.

SATOH, M. *et al.* Renal interstitial fibrosis is reduced in angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol* [S.I.], v. 12, n. 2, p. 317-25, Feb 2001.

SCHANSTRA, J. P. *et al.* The protective effect of angiotensin converting enzyme inhibition in experimental renal fibrosis in mice is not mediated by bradykinin B2 receptor activation. *Thromb Haemost* [S.I.], v. 89, n. 4, p. 735-40, Apr 2003.

SCHLONDORFF, D. O. Overview of factors contributing to the pathophysiology of progressive renal disease. *Kidney Int* [S.I.], v. 74, n. 7, p. 860-6, Oct 2008.

SEMEDO, P. *et al.* Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. *Stem Cells* [S.I.], v. 27, n. 12, p. 3063-73, Dec 2009.

SHAO, X. H. *et al.* Effects of He-Ne laser irradiation on chronic atrophic gastritis in rats. *World J Gastroenterol* [S.I.], v. 11, n. 25, p. 3958-61, Jul 7 2005.

SISTI, K. E. *et al.* Analysis of titanium surface irradiated with laser, with and without deposited of durapatite. *Acta Cir Bras* [S.I.], v. 21 Suppl 4, p. 57-62, 2006.

ST PETER, W. L. Introduction: chronic kidney disease: a burgeoning health epidemic. *J Manag Care Pharm* [S.I.], v. 13, n. 9 Suppl D, p. S2-5, Dec 2007.

ST PETER, W. L. *et al.* Chronic kidney disease: issues and establishing programs and clinics for improved patient outcomes. *Am J Kidney Dis* [S.I.], v. 41, n. 5, p. 903-24, May 2003.

STAHL, P. J.; FELSEN, D. Transforming growth factor-beta, basement membrane, and epithelial-mesenchymal transdifferentiation: implications for fibrosis in kidney disease. *Am J Pathol* [S.I.], v. 159, n. 4, p. 1187-92, Oct 2001.

STRUTZ, F. *et al.* Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* [S.I.], v. 130, n. 2, p. 393-405, Jul 1995.

SWEENEY, P. *et al.* An autoradiographic study of regional blood flow distribution in the rat kidney during ureteric obstruction--the role of vasoactive compounds. *BJU Int* [S.I.], v. 88, n. 3, p. 268-72, Aug 2001.

TEPASS, U. *et al.* Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* [S.I.], v. 1, n. 2, p. 91-100, Nov 2000.

VIEIRA, J. M., JR. *et al.* Simvastatin attenuates renal inflammation, tubular transdifferentiation and interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. *Nephrol Dial Transplant* [S.I.], v. 20, n. 8, p. 1582-91, Aug 2005.

VIELHAUER, V. *et al.* Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes. *J Am Soc Nephrol* [S.I.], v. 12, n. 6, p. 1173-87, Jun 2001.

VLADIMIROV, Y. A. *et al.* Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Mosc)* [S.I.], v. 69, n. 1, p. 81-90, Jan 2004.

WANG, Y. *et al.* Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein. *J Am Soc Nephrol* [S.I.], v. 8, n. 10, p. 1537-45, Oct 1997.

WOLFE, R. A. *et al.* Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* [S.I.], v. 341, n. 23, p. 1725-30, Dec 2 1999.

WU, C. S. *et al.* Low-energy helium-neon laser therapy induces repigmentation and improves the abnormalities of cutaneous microcirculation in segmental-type vitiligo lesions. *Kaohsiung J Med Sci* [S.I.], v. 24, n. 4, p. 180-9, Apr 2008.

WYNN, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* [S.I.], v. 214, n. 2, p. 199-210, Jan 2008.

YAAKOBI, T. *et al.* Long-term effect of low energy laser irradiation on infarction and reperfusion injury in the rat heart. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 90, n. 6, p. 2411-9, Jun 2001.

YAMASHITA, T. *et al.* Intense pulsed light therapy for superficial pigmented lesions evaluated by reflectance-mode confocal microscopy and optical coherence tomography. *J Invest Dermatol* [S.I.], v. 126, n. 10, p. 2281-6, Oct 2006.

YANG, J.; LIU, Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* [S.I.], v. 159, n. 4, p. 1465-75, Oct 2001.

YANG, J.; LIU, Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* [S.I.], v. 13, n. 1, p. 96-107, Jan 2002.

YARGER, W. E. *et al.* Obstructive nephropathy in the rat: possible roles for the renin-angiotensin system, prostaglandins, and thromboxanes in postobstructive renal function. *J Clin Invest* [S.I.], v. 65, n. 2, p. 400-12, Feb 1980.

YASUKAWA, A. *et al.* The effect of low reactive-level laser therapy (LLLT) with helium-neon laser on operative wound healing in a rat model. *J Vet Med Sci* [S.I.], v. 69, n. 8, p. 799-806, Aug 2007.

ZEISBERG, M. *et al.* BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* [S.I.], v. 9, n. 7, p. 964-8, Jul 2003.

ZEISBERG, M.; KALLURI, R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med* [S.I.], v. 82, n. 3, p. 175-81, Mar 2004.

ZEISBERG, M. *et al.* Renal fibrosis. Extracellular matrix microenvironment regulates migratory behavior of activated tubular epithelial cells. *Am J Pathol* [S.I.], v. 160, n. 6, p. 2001-8, Jun 2002.

ZYCINSKI, P. *et al.* Laser biostimulation in end-stage multivessel coronary artery disease--a preliminary observational study. *Kardiol Pol* [S.I.], v. 65, n. 1, p. 13-21; discussion 22-3, Jan 2007.