Daniel de Oliveira Martins

**Uso do laser de baixa intensidade e os mecanismos celulares e
moleculares no processo de reparação no sistema nervoso periférico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

Daniel de Oliveira Martins

Uso do laser de baixa intensidade e os mecanismos celulares e
moleculares no processo de reparação no sistema nervoso periférico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Marucia Chacur
Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de
Britto

Versão Original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Martins, Daniel de Oliveira.

Uso do laser de baixa intensidade e os mecanismos celulares e moleculares no processo de reparação do sistema nervoso periférico / Daniel de Oliveira Martins. – São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Marucia Chacur.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Neuroanatomia funcional da dor.

Versão do título para o inglês: Use of low-level laser and mechanisms in molecular and cellular repair process in peripheral nervous system.

1. Dor neuropática 2. Laserterapia 3. Nervo alveolar inferior 4. Neurotrofinas 5. Regeneração I. Chacur, Profa. Dra. Marucia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB037/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Daniel de Oliveira Martins.

Título da Tese: Uso do laser de baixa intensidade e os mecanismos celulares e moleculares no processo de reparação do sistema nervoso periférico.

Orientador(a): Profa. Dra. Marucia Chacur.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2418 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cepaich.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **150** nas fls. **95** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Marucia Chacur, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Uso do laser de baixa intensidade e os mecanismos celulares e moleculares no processo de reparação no sistema nervoso periférico** do qual participam o(s) alunos **Daniel de Oliveira Martins** e o pesquisador **Luiz Roberto G. de Britto**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **15.12.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 13 de dezembro de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cap. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of. CEUA. 084.13

São Paulo, 30 de outubro de 2013.

REF.: Protocolo nº 150/10.

"Uso do laser de baixa intensidade e os mecanismos celulares e moleculares no processo de reparação no sistema nervoso periférico"

Prezada Professora,

Sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, foi prorrogada até 15.12.2016.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ USP

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Marucia Chacur
Departamento de Anatomia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Dedico este trabalho a minha família, ao meu irmão Joilson por ter me incentivado e apresentado à vida científica; a Soraia, minha companheira de todas as horas e a todos que direta ou indiretamente participaram em sua elaboração e desenvolvimento. A todos, meu Muito obrigado!

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus, por todas as permissões de seguir em frente e buscar meus objetivos, mesmo quando isso parecia impossível.

Agradeço a minha família, em especial minha Mãe Cleonice, que pode me dar estrutura para que eu pudesse seguir pelo caminho que escolhi.

Agradeço ao Prof^o Britto, por abrir as portas do Laboratório de Neurobiologia Celular, e por ter participado diretamente do meu desenvolvimento na área da pesquisa básica, o que foi fundamental para que eu pudesse ingressar no Doutorado Direto. Agradeço a todos que fizeram parte deste laboratório e o tornou um lugar inesquecível. Em especial quero agradecer ao Adilson, técnico do laboratório e grande amigo, por toda sua disposição em ajudar e ensinar. Ao Mauro, que foi minha dupla de trabalho durante boa parte do tempo que fiquei por lá. E quem sempre me incentivou a não se acomodar com o que já estava feito.

Agradeço a minha orientadora, Maru, por ter aceitado e acreditado de imediato na proposta de projeto que lhe apresentei e que gostaria de desenvolver. Agradeço ainda mais, por ter permitido que eu pudesse desenvolver o meu trabalho livremente e principalmente pelo fato de, muito mais do que desenvolver um projeto, conseguimos desenvolver uma linha de pesquisa sobre o tema inicialmente proposto.

Agradeço aos amigos do Neurodor, todos sabem que sempre comento: Que um bom ambiente de trabalho é fundamental para o sucesso de qualquer desafio. E vocês sempre me proporcionaram o melhor ambiente de trabalho possível e imaginável. Pri, pela loucura e sinceridade e por sempre trazer mais informações sobre os mais diversos protocolos. Aline, pela companhia nas disciplinas, por mais estressantes que fossem. A Mi, pela ajuda de sempre, em especial nas correrias do lab. A Mara, por sempre se preocupar e por compartilhar os artigos e resumos de laserterapia. Ao Fábio, pelas risadas, momentos de descontração e por sempre acelerar o ritmo dos trabalhos. A Joyce, Alyne, Bianca, Igor e Rafael por também fazerem parte da história do nosso laboratório.

Todo mundo é capaz de dominar a dor, exceto quem a sente.

William Shakespeare

RESUMO

Martins DO. Uso do laser de baixa intensidade e os mecanismos celulares e moleculares no processo de reparação no sistema nervoso periférico. [Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

A dor neuropática orofacial devido à extração de dentes, pulpectomia ou implante dentário é difícil de tratar e em alguns pacientes, pode durar por vários anos. A lesão do nervo alveolar inferior (NAI; terceiro ramo do nervo trigêmeo) está relacionada rotineiramente à prática odontológica. Estudos experimentais têm sido desenvolvidos na tentativa de melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos da regeneração nervosa e suas complicações. Clinicamente, têm se buscado terapêuticas cujo objetivo é melhorar a qualidade de vida desses pacientes. Já que a dor é um fator debilitante em suas vidas. A regeneração do nervo é considerada um fenômeno altamente complexo resultante de uma cascata de eventos que visam à preparação do microambiente do nervo lesionado para o crescimento axonal dirigido. Há relatos na literatura demonstrando que a terapia com laser de baixa intensidade promove uma aceleração no reparo e aumento na densidade média das fibras nervosas. Porém, grande parte dos estudos está focada apenas em se provocar a injúria e observar sua recuperação, espontânea ou induzida, por cirurgia reparadora ou por irradiação com laser. Neste projeto utilizamos o modelo de lesão por esmagamento do NAI e associamos a laserterapia para estimular a reparação nervosa, também avaliamos a sensibilidade dolorosa dos animais antes da indução da lesão, e após o tratamento com laser, utilizando o modelo de alodínia mecânica. Observamos em nosso trabalho que o protocolo proposto foi capaz de reverter o comportamento hipernociceptivo (a partir da segunda sessão) e que a modulação de receptores para glutamato, de neurotrofinas, do receptor de potencial transiente vanilóide do subtipo 1 (TRPV-1), de substância p (SP) e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) estão associadas com este processo. Adicionalmente, o laser foi capaz de alterar o microambiente local da lesão por meio da modulação de proteínas, como laminina, proteína mielínica zero e neurofilamentos, que atuam para criar um ambiente permissivo para os axônios crescerem, influenciando a regeneração do nervo; ainda usamos a técnica de microscopia eletrônica para demonstrar a ação reparadora do laser, a qual foi evidenciada pelo aumento no número de fibras nervosas e da espessura da bainha de mielina do nervo do grupo tratado em relação ao grupo operado. Em conjunto, os resultados obtidos contribuem para reforçar o potencial terapêutico do laser como um tratamento para a dor relacionada à lesão de nervos periféricos, contribuindo também para a aceleração da taxa de recuperação do nervo. Finalmente, esperamos que estes resultados possam ser usados para melhorar os tratamentos atuais, utilizando a aplicação do laser em novas estratégias de tratamentos integrados para lesões de nervos periféricos sejam elas de causas idiopáticas, iatrogênicas ou devido a traumas.

Palavras-chave: Dor neuropática. Laserterapia. Nervo alveolar inferior. Neurotrofinas. Regeneração.

ABSTRACT

Martins DO. Use of low-level laser and mechanisms in molecular and cellular repair process in peripheral nervous system. [Ph. D. thesis (Morfofuncional Science)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Orofacial neuropathic pain due to tooth extraction, pulpectomy or dental implantation is difficult to treat and in some patients can last for several years. The injury to the inferior alveolar nerve (IAN; third branch of the trigeminal nerve), is related to routine dental practice. Experimental studies have been developed in an attempt to better understand the pathophysiological mechanisms of nerve regeneration and its complications. Clinically, have sought therapies aimed at improving the quality of life of these patients. Since pain is a debilitating factor in their lives. Nerve regeneration is considered to be a highly complex phenomenon resulting from a cascade of events aiming at the preparation of the microenvironment of the injured nerve for directed axonal growth. There are reports in the literature demonstrating that low level laser therapy promotes acceleration in the repair and increase in the average density of nerve fibers. However, most studies are focused only on cause a nerve injury and observe spontaneous or induced recovery, whether by restorative surgery or laser irradiation. In this project, we use the model of peripheral nerve crushed-injury and we associate laser therapy to stimulate nerve repair, we also evaluated the soreness of animals before induction of injury, and after treatment with laser therapy, using model mechanical allodynia. We observed in our study that the proposed protocol was able to reverse the hypernociceptive behaviour (from the second session) and modulation of receptors for glutamate, neurotrophins, and transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV-1), substance P (SP) and the calcitonin gene-related peptide (CGRP) are associated with this process. Additionally, the laser was able to alter the local microenvironment of the lesion by modulating proteins such as laminin, myelin protein zero and neurofilaments which act to create a permissive environment for growing axons by influencing the nerve regeneration; still we use the technique of electron microscopy to demonstrate the restorative action of the laser, which was evidenced by the increase in the number of nerve fibers and the thickness of the group of nerve myelin sheath treated in relation to the operated group. Together, these results contribute to enhance the therapeutic laser as a potential treatment for pain associated with peripheral nerve injury, also contributing to the acceleration of nerve recovery rate. Finally, we hope that these results will be used to improve current treatments using laser application in new integrated treatment strategies for peripheral nerve injuries whether they are idiopathic causes, iatrogenic or due to trauma.

Keywords: Neuropathic pain. Laser therapy. Inferior alveolar nerve. Neurotrophins. Regeneration.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Ilustração do gânglio do trigêmeo e do nervo alveolar inferior em ratos.
- Figura 2 -** Ilustração da mitocôndria, bem como da cadeia de transporte de elétrons e metabolismo oxidativo.
- Figura 3 -** Ilustração da cirurgia de acesso e lesão do nervo alveolar inferior.
- Figura 4 -** Ilustração do teste de estimulação tátil.
- Figura 5 -** Efeito da laserterapia sob a resposta nociceptiva (estimulação tátil) nos ratos com lesão no nervo alveolar inferior.
- Figura 6 -** Efeito da laserterapia sobre a expressão proteica do fator de crescimento neural.
- Figura 7 -** Efeito da laserterapia sobre a expressão proteica do fator neurotrófico derivado do cérebro.
- Figura 8 -** Efeito da laserterapia sobre a expressão do receptor TRPV-1
- Figura 9 -** Efeito da laserterapia sobre a expressão proteica da substância P
- Figura 10 -** Efeito da laserterapia sobre a expressão de CGRP
- Figura 11 -** Efeito da laserterapia sobre a expressão proteica do receptor para glutamato do tipo 1.
- Figura 12 -** Efeito da laserterapia sobre a expressão proteica do receptor para glutamato do tipo 2.
- Figura 13 -** Efeito da laserterapia sobre a expressão proteica o receptor para glutamato do tipo 1 em diferentes tempos de tratamento.

Figura 14 - Efeito da laserterapia sobre a expressão proteica do receptor para glutamato do tipo 2 em diferentes tempos de tratamento.

Figura 15 – Efeito da laserterapia sobre a expressão proteica de laminina.

Figura 16 – Efeito da laserterapia sobre a expressão proteica da Proteína Mielínica Zero (P0).

Figura 17 - Efeito da laserterapia sobre a expressão proteica de Neurofilamentos.

Figura 18 – Fotomicrografias eletrônica do nervo alveolar inferior.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Especificações sobre os parâmetros do laser de baixa intensidade utilizados neste estudo.
- Tabela 2 -** Anticorpos utilizados nos experimentos de *immunoblotting* e suas respectivas concentrações.
- Tabela 3 -** Dados morfométricos do NAI

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - Trifosfato de Adenosina

BDNF - *Brain Derived Neurotrophic Factor* (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro)

DRG - Dorsal Root Ganglion (Gânglio da Raiz Dorsal- Posterior)

GaAs - Arseneto de Gálio

GluR 1 - Receptor para Glutamato do tipo 1

GluR 2 - Receptor para Glutamato do tipo 2

GT - Gânglio Trigêmeo/trigeminal

LASER - *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* – Amplificação da Luz por

Emissão de Radiação Estimulada

LBI - LASER de baixa intensidade

MI - Medida Inicial

MF - Medida Final

NAI - Nervo Alveolar Inferior

NET - Núcleo Espinal do Trigêmeo

NF - Neurofilamento

NGF - Fator de Crescimento Neural

NT - Neuralgia do trigêmeo

NTs - Neurotrofinas

Op - Grupo Operado

Op + Laser - Grupo Operado com Laserterapia

s - Sessão

Sham + Laser - Grupo Falso-operado com Laserterapia

SNP - Sistema Nervoso Periférico

SNC - Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1 NEUROANATOMIA	18
1.2 LESÃO DO NERVO ALVEOLAR INFERIOR	19
1.3 DOR E NOCICEPÇÃO	20
1.4 TRANSMISSÃO NOCICEPTIVA DA REGIÃO OROFACIAL	21
1.5 DOR NEUROPÁTICA	22
1.6 DOR TRIGEMINAL	24
1.7 LASERTERAPIA	25
1.8 FATORES NEUOTRÓFICOS	28
1.9 RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS	29
1.10 MEDIADORES DA DOR	31
1.11 MICROAMBIENTE DA LESÃO	33
2 OBJETIVOS.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 ANIMAIS.....	37
3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA INDUÇÃO DE DOR NEUROPÁTICA	37
3.3 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOLOROSA	39
3.3.1 ALODINIA MECÂNICA	39
3.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E APLICAÇÃO DO LASER PÓS-LESÃO DO NAI EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS	40
3.5 ANTICORPOS UTILIZADOS	42
3.6 ENSAIOS DE WESTERN BLOTTING	43
3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DO NAI	44
3.8 GRUPOS EXPERIMENTAIS	44
3.9 ANÁLISE DOS RESULTADOS	45
4 RESULTADOS	46
4.1 EFEITO DA LASERTERAPIA SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA LESÃO DO NERVO ALVEOLAR INFERIOR	46
4.1.1 EFEITO NA ALODINIA TÁTIL	46
4.2 ENSAIOS DE WESTERN BLOTTING	47
4.3 EFEITO SOBRE AS NEUOTROFINAS NGF E BDNF	47
4.4 EFEITO SOBRE MEDIADORES NOCICEPTIVOS	50

4.4.1 EFEITO SOBRE A EXPRESSÃO DE TRPV-1	50
4.4.2 EFEITO SOBRE A EXPRESSÃO DE SP	51
4.4.3 EFEITO SOBRE A EXPRESSÃO DE CGRP	52
4.5 EFEITO SOBRE OS RECEPTORES PARA GLUTAMATO	53
4.6 EFEITO SOBRE OS RECEPTORES PARA GLUTAMATO (AVALIAÇÃO TEMPORAL)	56
4.7 EFEITO SOBRE O MIROAMBIENTE DA LESÃO	58
4.7.1 EFEITO SOBRE A PROTEÍNA ESTRUTURAL LAMININA	58
4.7.2 EFEITO SOBRE A PROTEÍNA MIELÍNICA ZERO (P0)	59
4.7.3 EFEITO SOBRE NEUROFILAMENTOS	60
4.8 EFEITO SOBRE A REGENERAÇÃO DO NAI	61
5 DISCUSSÃO.....	63
6 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS*	74
ANEXOS:.....	93
A: BOLSA DE ESTÁGIO DE PESQUISA NO EXTERIOR (BEPE).....	93
B: ARTIGO PUBLICADO COM DADOS REFERENTES AO TRABALHO.	96

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 NEUROANATOMIA

O nervo trigêmeo, V par craniano, é responsável pela condução da maior parte das informações somestésicas da face, conjuntiva ocular, dura-máter e cavidade oral, além da inervação motora da musculatura mastigatória. O sistema trigeminal é composto por fibras que se apresentam ou como terminações nervosas livres ou associadas a componentes sensoriais especializados para detecção de estímulos táteis inócuos ou proprioceptivos, sendo que a maior parte dos corpos celulares dessas fibras sensoriais encontra-se no gânglio do trigêmeo localizado em uma depressão do crânio, ventralmente à ponte e também denominado gânglio semilunar ou de Gasser (Waite, 2004); enquanto que os corpos celulares das fibras motoras localizam-se na ponte, mais especificamente no núcleo mesencefálico do trigêmeo (Davies, 2010; Sessle, 2000).

O complexo trigeminal é composto por quatro núcleos: o principal, o mesencefálico e o núcleo do trato espinal, responsáveis pelo processamento de informações somestésicas e proprioceptivas; e o núcleo motor do trigêmeo, responsável pela inervação motora da musculatura mastigatória. O núcleo principal do trigêmeo recebe projeções de mecanorreceptores da face e cavidade oral, sendo considerado o análogo trigeminal dos núcleos da coluna dorsal (Sessle, 2006).

O nervo trigêmeo é assim denominado por possuir três calibrosos ramos, divergentes, distribuídos tanto na superfície como em profundidade em relação à face. É um nervo misto, no qual cada divisão é classificada, conforme a estrutura e distribuição a que se relaciona (Machado, 1993; Madeira, 1997). O primeiro ramo denomina-se oftálmico (órbita); o segundo, maxilar (maxila); o último, mandibular (mandíbula). Em humanos, o gânglio do trigêmeo localiza-se na parte petrosa do osso temporal e em ratos encontra-se na base do crânio (Figura 1) (Waite, 2003).

O nervo alveolar inferior, ramo do nervo mandibular, passa no interior do canal da mandíbula e é o responsável pela sensibilidade da polpa dos dentes inferiores, tecido ósseo, papilas interdentais, periodonto, lábio inferior, mucosa e gengiva vestibular dos dentes anteriores. A posição do canal da mandíbula é de interesse para o cirurgião dentista que realiza procedimentos cirúrgicos mandibulares como cirurgias ortognáticas, reconstruções

mandibulares, exodontias de terceiros molares inferiores ou ainda procedimentos de implantodontia (Marzola, 2005).

No interior do canal da mandíbula, o nervo alveolar inferior é composto por um número variável de fibras (duas a cinco) envolvidas em uma bainha comum com vasos alveolares, ligados por numerosos ramos alveolares, ramos comunicantes que formam o plexo dental inferior. Qualquer que seja sua estrutura macroscópica, até hoje não foi possível esclarecer sua sistematização funcional. Neste aspecto, a dissecação anatômica é capaz de acompanhar até o final os filetes que inervam os tecidos implicados (Machado, 1993).

Figura 1 - O sistema sensorial trigeminal é responsável pela transmissão da informação da cabeça e da face. Dependendo da região anatômica estes tecidos são inervados por um de seus troncos: oftálmico (V1), maxilar (V2) e mandibular (V3). O NAI (a) é o responsável pela sensibilidade da polpa dos dentes inferiores, tecido ósseo, papilas interdentes, periodonto, lábio inferior, mucosa e gengiva vestibular dos dentes anteriores. Adaptado de Waite PM, 2003. FONTE: Waite PM, 2003.

1.2 LESÃO DO NERVO ALVEOLAR INFERIOR

O nervo alveolar inferior (NAI) está relacionado rotineiramente à prática odontológica, por ser alvo constante das anestésias utilizadas em tratamentos dos dentes inferiores, e pela proximidade de seu trajeto à região cirúrgica de extração dos dentes terceiros molares inferiores (Fehrenbach; Herring, 2013; Loescher et al., 2003; Strauss et al., 2006). Além disso, com o advento dos implantes e a tentativa de reabilitar pacientes desdentados parciais ou totais com reabsorção severa na região mandibular acrescentou-se mais uma preocupação com as eventuais alterações neurossensoriais provocadas por esses procedimentos (Khawaja; Renton, 2009).

A lesão do NAI, apesar de não ser a mais comum, é de grande relevância para o cirurgião dentista, pois origina distúrbios fisiológicos e psicológicos. Com a lesão, há o bloqueio de um arco neural importante. As fibras envolvidas no sistema mastigatório têm origem no núcleo mesencefálico do V nervo craniano. Com seu rompimento, ocorre a perda da ligação do arco, e, desta forma, um componente inibitório que controla a força de mordida fica ausente. São comuns os relatos de acúmulo de restos alimentares sobre a região de mucosa jugal, mordidas frequentes na língua ou lábio, queimaduras e dores (Prado, 2004).

Progrel e Kaban (1993) revelaram que grande parte das alterações neurais sensoriais neste nervo se dá através da extração de terceiros molares. Em aproximadamente 96% dos casos, o retorno espontâneo da sensibilidade na região afetada ocorre em 24 meses. Sendo que as principais queixas se dividem entre dores espontâneas, aquelas que aparecem sem nenhum estímulo detectável, e dores evocadas, que são respostas anormais a um estímulo.

As dores espontâneas são descritas como parestesias e disestesias. A parestesia é caracterizada por sensações anormais, como os formigamentos e os agulhamentos. Já a disestesia ocorre normalmente como uma sensação de “queima”. As dores evocadas são classificadas como hiperalgesia e alodinia. A hiperalgesia é a resposta exagerada a um estímulo que normalmente já é doloroso e a alodinia por sua vez é uma dor produzida por um estímulo que normalmente não provocaria dor, como por exemplo, um leve toque na pele (Woolf, 2004).

Em casos de diagnóstico de algum distúrbio neurossensorial, o tratamento deve ser implementado de forma imediata, dada a dificuldade de reparo do tecido nervoso e o desconforto enfrentado pelo paciente enquanto situado nesta condição. A irradiação com laser de baixa intensidade e o uso de medicamentos e de complexos vitamínicos está entre as formas de tratamento mais descritas na literatura (Epelbaum, 2007).

1.3 DOR E NOCICEPÇÃO

A palavra dor, na língua portuguesa é derivada do latim *dolore* e “pain” na língua inglesa, do grego: *poiné*, pena. E segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) é definida com uma “experiência sensitiva e emocional associada ao dano tecidual real ou potencial ou à descrição desses danos”.

A dor pode ser classificada de acordo com a duração e com a patogênese. De acordo com a duração pode ser aguda ou crônica. De acordo com a patogênese, a dor pode ser

principalmente nociceptiva ou neuropática. A dor nociceptiva ocorre por ativação fisiológica de nociceptores e pode estar relacionado à lesão da pele, órgãos viscerais, tecidos ósseos, musculares ou ligamentares ou somente por meio da ativação destes nociceptores (Bennet, 2006). A dor neuropática é definida como uma dor que afeta o sistema sensorial (Backonja, 2003).

O componente fisiológico da dor é chamado nocicepção, que consiste dos processos de transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo. De forma simplificada, pode ser considerado como uma cadeia de três-neurônios, com o neurônio de primeira ordem originado na periferia e projetando-se para a medula espinal, o neurônio de segunda ordem que ascende pela medula espinal e o neurônio de terceira ordem que se projeta para o córtex cerebral (Tranquilli, 2004).

Segundo Pisera (2005) o primeiro processo da nocicepção é a decodificação de sensações mecânica, térmica e química em impulsos elétricos por terminais nervosos especializados denominados nociceptores (Pisera, 2005). Os receptores nociceptivos são representados pelas terminações nervosas livres presentes nas fibras mielínicas finas A δ e amielínicas C. As fibras C são fibras não mielinizadas, também chamadas fibras do grupo IV, com menor velocidade de condução (< 1 m/s) e respondem a estímulos nocivos de origem térmica, mecânica ou química. As fibras A δ são fibras mielinizadas, também chamadas fibras do grupo III, com velocidade de condução de 5-30 m/s e respondem a estímulos térmicos e mecânicos (Julius, 2001).

A sensação de dor é composta por duas categorias: uma dor primária, rápida, forte e aguda e depois uma dor secundária, lenta e contínua. Esse padrão de dor é explicado pela diferença da velocidade de propagação do impulso nervoso nos dois tipos de fibras nervosas descritas anteriormente. O impulso nervoso de rápida condução dos nociceptores das fibras-A δ produz a sensação da dor primária, enquanto os nociceptores das fibras-C produzem a sensação da dor secundária (Patel, 2010).

1.4 TRANSMISSÃO NOCICEPTIVA DA REGIÃO OROFACIAL

O sistema trigeminal, com os neurônios de primeira ordem no gânglio do trigêmeo (GT), transmite a informação sensorial da maioria dos tecidos craniofaciais, incluindo as meninges, articulação temporomandibular e dentes (Shankland, 2000). Várias condições comuns de dor crônica, como enxaquecas, dores de cabeça recorrentes, disfunções

temporomandibulares e neuralgias do trigêmeo são mediadas por vias nociceptivas trigeminais (Pietrobon; Striessnig, 2003; Prasad; Galetta, 2009; Scrivani et al., 2008). Fibras sensoriais primárias que inervam a região orofacial derivam de neurônios do GT, na qual os processos centrais entram na ponte, onde eles descem no tronco cerebral como o trato trigeminal espinal (Lazarov, 2000, 2002). O GT é análogo ao gânglio da raiz dorsal do Sistema Nervoso Periférico (SNP). Os neurônios deste gânglio são do tipo pseudo-unipolar, no qual um único axônio possui ramos, periférico e central (Lazarov, 2002). Os corpos celulares dos nervos mandibulares, incluindo o NAI, quando estimulados liberam neuropeptídios que promovem a inflamação periférica e dor (Shankland, 2000). Uma variedade destes peptídeos que estão associados à nocicepção, é conhecida por estarem presentes nas fibras sensoriais e incluem o peptídeo geneticamente relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), substância P, somatostatina, galanina e encefalinas. Além disso, há uma evidência de que o glutamato é outro transmissor nestas mesmas fibras. Os tipos de fibras e transmissores nas estruturas orofaciais são um pouco diferente, e dependem de diferentes sítios (por exemplo, os dentes, língua, meninges, córnea, conjuntiva e mucosa oral e nasal) (Bereiter DA, 2010).

O núcleo espinal do trigêmeo (NET) é o local onde se encontram neurônios nociceptivos de segunda ordem do trigêmeo, e é dividido em três subnúcleos de caudal para rostral: *caudalis* (Vc), *interpolaris* (Vi), e *oralis* (Vo) (Sessle, 2000). O principal neurotransmissor no NET é o glutamato e outros agentes, tais como a substância P, ácido γ -aminobutírico e encefalina também estão presentes, e modulam a sinalização e processamento da informação sensorial orofacial a nível central (Fan et al., 2012). A partir da porção sensitiva do complexo trigeminal, as sensações álgicas, térmicas e proprioceptivas são veiculadas através de vias neurais específicas até o tálamo, de modo análogo ao que ocorre com as informações sensoriais, captadas em outros tecidos periféricos e transmitidas a partir da medula espinal (Waite, 2003).

1.5 DOR NEUROPÁTICA

A dor é geralmente o resultado da ativação de neurônios (nociceptores), que podem detectar estímulos nocivos de acontecimentos traumáticos agudos nos tecidos periféricos, tais como a pele e os órgãos viscerais. Esta forma de dor, chamada dor nociceptiva, é de autoproteção e normalmente evoca ações destinadas a limitar ou evitar danos adicionais ao

tecido. Esta dor nociceptiva geralmente é sensível aos tradicionais analgésicos como os opióides. Em contraste, a dor neuropática, que resulta da disfunção primária de um nociceptor periférico, bem como de nervos não-nociceptivos ou do sistema nervoso central, frequentemente possui duração maior que a fase inicial da lesão e pode levar a doenças debilitantes que não são passíveis de terapias com drogas convencionais disponíveis. Infelizmente, as terapias disponíveis atualmente para combater estes sintomas de dor neuropática têm uma eficácia limitada e / ou efeitos secundários graves. Por exemplo, drogas como a gabapentina e a pregabalina podem aliviar os sintomas da alodinia e da hiperalgesia. No entanto, mais de 50% dos pacientes que utilizam esses medicamentos relatam sentir efeitos secundários, sendo a sedação prolongada a mais notavelmente relatada, o que limita a sua utilização clínica (Edwards et al., 2008; Gooch; Podwall, 2004).

Nos últimos 50 anos, a indústria farmacêutica tem investido recursos substanciais para explorar os mecanismos centrais responsáveis pela dor neuropática (principalmente ao nível da medula espinal) e no desenvolvimento de soluções médicas para esta patologia comum e mórbida. Apesar do desenvolvimento de novos medicamentos [agindo principalmente através do sistema nervoso central (CNS)], a eficácia do tratamento para dor neuropática permaneceu a mesma (~33%) (Finnerup et al., 2010).

A prevalência de condições de dor crônica na população é alta (12 - 30%) e, embora os mecanismos subjacentes da dor crônica não serem totalmente compreendidos (Iwata et al., 2011; Sessle, 2011), pesquisas focadas na compreensão da plasticidade neurofisiológica do sistema nervoso em resposta à dor neuropática vêm utilizando inúmeros modelos animais para simular condições de neuropatias periféricas que acometem humanos, baseando-se em procedimentos em / ou perto do nervo isquiático. Estes modelos diferem na localização e tipo de lesão. Este último inclui (i) lesão constritiva crônica (ICC) por ligadura frouxa do nervo isquiático (Bennett; Xie, 1988), (ii) a ligadura apertada parcial do nervo isquiático (PSL) (Seltzer et al., 1990) e (iii) ligadura apertada de nervos espinais (SNL) (Kim; Chung, 1992). A lesão pode também ser evocada através de esmagamento (Devor; Govrin-Lippmann, 1979), inflamação perineural (DeLeo; Yeziarski, 2001) e por invasão tumoral (Shimoyama et al., 2002).

Neurônios aferentes primários são de particular interesse a partir de um ponto de vista terapêutico, uma vez que são os geradores de impulsos iniciais nocivos que viajam para as estações de retransmissão na medula espinal e do cérebro. Assim, a inibição da sensibilização e / ou excitação de neurônios sensoriais periféricos podem evitar subseqüentes eventos centrais, tais como a sensibilização e plasticidade. Portanto, mais importante ainda, será

encontrar um agente que module seletivamente a função do neurônio aferente primário e não atravesse a barreira hemato-encefálica, evitando assim os efeitos secundários mediados centralmente dos analgésicos convencionais (Stein et al., 2009).

1.6 DOR TRIGEMINAL

A dor na região do rosto e da boca (dor orofacial) pode ser particularmente preocupante para o paciente devido ao contexto especial, psicológico e emocional, desta área do corpo. A incidência anual da neuralgia do trigêmeo é de 4,3 por 100.000 na população geral (Krafft, 2008). Em muitos casos, a dor orofacial pode ser idiopática (pode surgir sem qualquer gatilho óbvio ou causa identificável) tais como síndrome da ardência bucal e dor facial atípica (Zakrzewska, 2009), no entanto, algumas condições podem resultar de patologias identificadas, tais como herpes (neuralgia pós-herpética) ou esclerose múltipla (responsável por alguns casos de Neuralgia Trigeminal) (Cruccu et al., 2009), bem como trauma às estruturas faciais e câncer (Kitt et al., 2000; Watson, 2004).

Neuralgia do trigêmeo (NT) é uma síndrome de dor crônica orofacial caracterizada por dor paroxística, tipo choque que está localizada nas divisões de um ou mais ramos do nervo trigêmeo. A patogênese da NT ainda é incerta (Coderre, 2006; Iwata et al., 2011; Sessle, 2011). Estas sensações anormais são bastante perturbadoras, uma vez que estes episódios são desencadeados normalmente durante atividades rotineiras como fala e mastigação (Fried et al., 2001). A etiologia sugerida para a maioria dos casos de neuralgia trigeminal é a compressão vascular de axônios centrais do nervo trigêmeo ao nível da ponte, resultando em desmielinização focal, que pode alterar a atividade elétrica dos neurônios trigeminais. No entanto, estas características foram inferidas apenas a partir de observações clínicas e não de estudos experimentais (Kitt et al., 2000).

Muitos estudos foram desenvolvidos para analisar estes mecanismos de desaferentação ou regeneração em ratos utilizando os mais diferentes modelos experimentais, como por exemplo, estudos de transecção completa ou esmagamento dos nervos infraorbital, alveolar inferior ou lingual (Henry et al., 2006; Iwata et al., 2004; Nomura et al., 2002; Ogawa et al., 2005; Robinson et al., 2004; Tsuboi et al., 2004). Ainda sim, é muito difícil definir um mecanismo definitivo para a neuralgia trigeminal, pois, mesmo que a lesão estrutural identifique o processo patológico em progresso, ela não é suficiente para explicar a patofisiologia da neuralgia trigeminal, isto é, os mecanismos que dão margem a este fenômeno clínico (Kitt et al., 2000). Outra limitação, diz respeito à participação do gânglio

trigeminal em resposta as lesões de nervos do sistema trigeminal, uma vez que o gânglio trigeminal, funciona como estação relé para os impulsos sensoriais da maioria das regiões da cabeça e face para o cérebro (Benoliel et al., 2001a).

Alguns estudos focaram em avaliar as consequências comportamentais, fisiológicas e neuroanatômicas em decorrência de lesões de constrição nervosa aplicadas ao sistema trigeminal (Benoliel et al., 2001a; Christensen et al., 1999; Vos; Strassman, 1995) estes trabalhos verificaram que há diferenças entre os efeitos das lesões aos nervos trigeminal e espinais, como por exemplo, ausência de expansão simpática após lesão de nervos do sistema trigeminal (Benoliel et al., 2001b) e menor atividade ectópica após axotomia comparada aos nervos espinais (Tal; Devor, 1992). Logo, se faz necessário novas abordagens sobre o tema tanto para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na gênese e manutenção da dor neuropática trigeminal quanto para a elaboração de novas terapias para o aperfeiçoamento das terapias já em uso, sejam elas medicamentosas, cirúrgicas ou terapias não invasivas como a laserterapia.

1.7 LASERTERAPIA

Albert Einstein, em 1916, descreveu pela primeira vez o fenômeno físico da emissão estimulada de radiação. A palavra Laser é a abreviatura de “*light amplification by stimulated emission of radiation*”. É uma forma de radiação não ionizante, altamente concentrada. O resultado depende do tecido irradiado e do tipo de laser utilizado (Nascimento, 2001).

A terapia por laser de baixa intensidade tem sido utilizada na Medicina e Odontologia nos últimos anos e, quando bem indicado, apresenta ótimos resultados. Na prática clínica os comprimentos de onda mais utilizados encontram-se entre 630 a 1300 nm, este intervalo é conhecido como “janela terapêutica” para tecidos biológicos (Baxter; Diamantopoulos, 1994).

O laser de baixa intensidade tem demonstrado eficiência devido à resposta que produz nos diversos tecidos, como redução do edema, controle do processo inflamatório, aumento da fagocitose, da síntese de colágeno e da epitelização (Ortiz, 2001). A ação da radiação laser de alta intensidade sobre um tecido se faz através de mecanismos térmicos, com subsequente elevação de sua temperatura. A sua utilização na área biomédica surgiu como consequência natural de suas propriedades; os lasers de alta intensidade são capazes de vaporizar e coagular os tecidos biológicos, oferecendo um campo cirúrgico sem sangramento e com certo grau de esterilização. A exposição de um corpo à radiação laser em baixa intensidade, com uma

densidade de potência de alguns mW/cm^2 , minimiza a possibilidade da manifestação de efeitos térmicos, já que a intensidade utilizada é baixa o bastante para que a temperatura não ultrapasse $37,5^\circ\text{C}$ (Ribeiro, 2004).

Os efeitos não térmicos produzidos pela radiação de baixa intensidade são amplamente discutidos, pois de certo modo não são conhecidos todos os mecanismos nem todos os elementos que participam da conversão de energia luminosa em energia bioquímica, capaz de gerar analgesia ou regeneração. Segundo alguns autores, os mecanismos que envolvem o processo de bioestimulação ocorrem em nível molecular. Neste caso, a luz laser penetra no interior do tecido onde é absorvido por determinados cromóforos, resultando no aumento do metabolismo celular através do aumento da síntese de ATP pelas mitocôndrias (Karu, 1999).

Uma das hipóteses aceitas para ação do laser de baixa intensidade é que as mitocôndrias são o principal alvo intracelular da luz de espectro vermelho e infra-vermelho. O citocromo C-oxidase (unidade IV da cadeia respiratória mitocondrial) é um cromóforo que absorve a luz tanto no infra-vermelho como 1000 nm (Figura 2) (Szundi et al., 2001). Estudos relatam o aumento da citocromo c oxidase após o uso do laser de baixa intensidade (Pastore et al., 2000) e também do aumento da síntese de ATP após a aplicação de laser em mitocôndrias isoladas (Karu, 1999).

Muitos estudos têm relatado o aumento intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) após a aplicação de laser in vitro (Lavi et al., 2003; Lubart et al., 2005; Zhang et al., 2008). Outro estudo mostrou que o pico de aumento da síntese de ATP é alcançado 5 min após a irradiação e decresce até os níveis basais em 6 horas (Chen et al., 2011).

O benefício direto da fotobiomodulação sobre a atividade da citocromo-oxidase foi testada e confirmada em neurônios primários funcionalmente inativados pela tetrodotoxina (TTX) (Wong-Riley et al., 2001; Wong-Riley et al., 2005) ou envenenados por cianeto de potássio (KCN), um inibidor irreversível da citocromo-oxidase. Assim, o tratamento com laser de baixa intensidade parece competir com inibidores de citocromo-oxidase na ativação desta enzima, o que resulta num aumento da atividade da enzima, aumento da produção de ATP, e uma maior atividade metabólica dos neurônios (Wong-Riley et al., 2005). Outro estudo mostra que a terapia com laser de baixa intensidade (AsGa, comprimento de onda de 904 nm) em animais aumenta significativamente as atividades dos complexos II e IV dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial, mas não afeta a atividade da succinato desidrogenase (SDH, uma parte do complexo II) (Silveira et al., 2007).

Figura 2- As mitocôndrias são consideradas os geradores de energia da célula eucariótica, por meio da conversão de oxigênio e nutrientes através do processo de fosforilação oxidativa e da cadeia de transporte de elétrons em trifosfato de adenosina (ATP), como mostrado na figura acima. Um efeito semelhante é produzida quando o tecido que contém as mitocôndrias é exposto à radiação de baixo nível. A luz visível e próximo do infra-vermelho é absorvida pela organela, e uma regulação positiva da respiração celular é observada (Hashmi et al., 2010). Adaptado de Hashmi J.T. et al. (2010). FONTE: Hashmi J.T. et al. (2010).

Estudos que focaram especificamente sobre o mecanismo de ação da laserterapia mostraram aumentos de metabólitos celulares e de moléculas de sinalização, incluindo ATP, espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO) (Prindeze et al., 2012). EROs têm ganhando mais atenção em estudos de laserterapia pelo fato de mostrarem um aumento de sua concentração como resultado da laserterapia (Chen et al., 2011; Lubart et al., 2005). Sendo que a síntese de ATP parece seguir a mesma correlação (Hu et al., 2007; Lapchak; De Taboada, 2010; Wong-Riley et al., 2005). É bem conhecido que em altas concentrações EROs são letais para a célula, mas se estiverem presentes em concentrações muito baixas, abaixo da necessária para a citotoxicidade, EROs têm uma ampla gama de efeitos estimulantes positivos sobre a célula. Por exemplo, EROs pode promover o crescimento celular e induzir a diferenciação de neurônios (Lubart et al., 2005; Veal et al., 2007).

Além disso, o laser de baixa intensidade promove efeitos semelhantes de modulação da inflamação e analgesia do que a medicação anti-inflamatória não esteroide, além de estimular a microcirculação local e a proliferação celular, favorecendo ainda mais os eventos de reparação no pós-operatório (Rochkind et al., 2001; Shamir et al., 2001). A terapia de laser de baixa intensidade também possui efeitos terapêuticos como, por exemplo, a aceleração de

cicatrização (Amorim et al., 2006; Gal et al., 2009), redução da sintomatologia dolorosa (Albrektsson; Hansson, 1986), restauração da função neural após o dano, aprimoramento da remodelação e reparo ósseo, normalização da função hormonal, estímulo de liberação de endorfina e modulação do sistema imune (Milorio et al., 2002; Rochkind et al., 2007a).

No entanto, ainda há na laserterapia grande controvérsia quanto à dose correta para aplicação em cada afecção específica. Muitos parâmetros encontram-se em fase de análise experimental, tais como dose a ser utilizada, tempo de aplicação do laser, o tempo de tratamento, a densidade de energia, a frequência de aplicações, as características do aparelho, o sistema óptico, o feixe de luz, a transmissão, a dispersão, a absorção e a profundidade do tecido tratado (Kreisler et al., 2002; Tuner; Hode, 1998).

1.8 FATORES NEUOTRÓFICOS

O desenvolvimento do sistema nervoso (SN) é um processo longo e que envolve inúmeras etapas. Entre a neurogênese e a sinaptogênese, um único neurônio se depara com uma variedade de fatores ambientais que podem influenciar profundamente seu crescimento, diferenciação e sobrevivência (Zigmond, 1999).

Somado ao efeito de promoção da sobrevivência, os fatores neurotróficos também estão envolvidos no processo de diferenciação neuronal e crescimento axonal. As células gliais representam uma importante fonte natural de fatores neurotróficos, promovendo um efeito positivo na sobrevivência neuronal e crescimento axonal não somente durante o processo de desenvolvimento do sistema nervoso, mas também após um episódio de lesão (Pellitteri et al., 2006).

No sistema nervoso central de mamíferos, os principais representantes da família das neurotrofinas (NTs) são o NGF (fator de crescimento neuronal, do inglês *nerve growth factor*), o BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo, do inglês *brain-derived neurothophic factor*) e as neurotrofinas NT-3 e NT-4 (Huang; Reichardt, 2001) que se ligam a receptores específicos tirosina-quinase (Trk), provocando sua dimerização e ativação (Huang; Reichardt, 2003).

Existem três tipos de receptores do tipo tirosina-quinase (TrK) onde as neurotrofinas atuam: TrkA, cujo ligante é NGF; TrkB, cujos ligantes são BDNF e NT-4; e TrkC, ao qual se liga NT-3 (Dawbarn; Allen, 2003). Todas as NTs também podem se ligar, com menor afinidade que a ligação aos receptores Trk, ao receptor p75NTR, membro da família do fator de necrose tumoral (Lu et al., 2005). A função desse receptor é internalizar os fatores de

crescimento, os quais irão ativar determinados genes, promovendo a sobrevivência e regeneração (Chao, 2003).

A utilização de fatores de crescimento como o NGF, tem sido estudada há muito tempo em relação às lesões neurais. Muitas pesquisas demonstram o NGF como um fator estimulador da resposta reparadora no nervo, utilizando diversas formas de entrega do fator para o interior de tubo guia, desde micro bombas até sua incorporação dentro da parede do tubo para sua liberação por difusão (Raghoobar et al., 2007). A utilização de componentes celulares no interior de um conduto biológico artificial [cujo objetivo é formar uma ponte ligando os cotos proximal e distal (Kingham; Terenghi, 2006)] tem sido alternativa de suplementação, já que sua presença é fundamental para o processo de regeneração nervosa (Battiston et al., 2007).

A neurotrofina BDNF é um potente fator fisiológico de sobrevivência que também tem sido implicado em uma variedade de condições patofisiológicas. Embora os fatores neurotróficos aumentem a sobrevivência celular por promover o suporte trófico necessário, agora se sabe que seus efeitos de promoção de sobrevivência são mediados, em grande parte, pela inibição da cascata de morte celular (Almeida et al., 2005). Além disso, já está bem estabelecido o papel do BDNF como um modulador endógeno de vias nociceptivas (Merighi et al., 2008; Obata; Noguchi, 2006; Pezet et al., 2002). Sabe-se que a concentração de BDNF aumenta na porção lombar do corno dorsal da medula espinal em ratos com hiperalgesia térmica após ligadura frouxa do nervo isquiático (Miletic; Miletic, 2002), e que a expressão da proteína BDNF aumenta em neurônios do gânglio da raiz dorsal após lesão do nervo isquiático (Ha et al., 2001). Estudos têm relatado que a injeção intratecal de trkB-IgG e anti-BDNF impede o desenvolvimento de hiperalgesia térmica e alodinia mecânica nos modelos de dor neuropática (Obata et al., 2006; Yajima et al., 2005).

Estes resultados sugerem que o aumento da liberação de BDNF endógeno induzida pela lesão de um nervo pode provocar um aumento da excitabilidade dos neurônios do corno dorsal da medula espinal, através da ativação do receptor de TrkB e produzir um estado semelhante a dor neuropática (Geng et al., 2010).

1.9 RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS

O sistema glutamatérgico envolve uma série de receptores que são ativados pelo aminoácido glutamato (Cotman et al., 1988). O glutamato é considerado o maior

neurotransmissor excitatório do SNC (Meldrum, 2000). O sistema glutamatérgico inclui receptores ionotrópicos e receptores metabotrópicos. Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR) agem através de segundos mensageiros via ativação da proteína G. Em condições fisiológicas, a ativação de mGluRs via glutamato produz uma corrente pós-sináptica lenta. Os mGluRs estão presentes em todas as regiões do cérebro e vêm sendo considerados um dos maiores moduladores de segundo mensageiros no SN em mamíferos. Os receptores ionotrópicos são canais iônicos que, quando ativados, permitem a entrada de cátions favorecendo a despolarização do neurônio. Eles são divididos em receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA), receptores ácido alfa-Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e cainato. Os receptores AMPA e cainato se localizam em regiões do SN e mediam a transmissão rápida em sinapses excitatórias. A família de receptores do tipo AMPA é composta por quatro genes GLU_{A1-4} (GluR1-4 ou GluRA-D). Quando ativados, estes receptores induzem uma despolarização rápida do neurônio pós-sináptico que dura somente alguns milissegundos (Armstrong; Gouaux, 2000).

A ativação do (NMDA) em neurônios do corno dorsal da medula espinal é fundamental para o desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia induzida pela lesão do nervo. Considera-se que a ativação de receptores NMDA no sistema nervoso central inicia um influxo de Ca, induzindo processos intracelulares Ca-dependente. Estas observações suportam a ideia de que o NMDA desempenha um papel importante no desenvolvimento da lesão do nervo evocando condições de dor patológica como alodinia, hiperalgesia e dor fantasma (Yonehara et al., 2003).

Os receptores do N-metil-D-aspartato ou receptores NMDA têm sido alvo de uma grande quantidade de estudos. Tradicionalmente, estes receptores têm sido relacionados com a propagação e perpetuação dos impulsos dolorosos. São locais do acoplamento do L-glutamato, um neurotransmissor de grande importância para nocicepção de mamíferos, o qual tem sido encontrado, conjuntamente com outros neurotransmissores e neuromoduladores, nas fibras mielinizadas ou não-mielinizadas (Bleakman et al., 2006).

Por causa das funções bem estabelecidas de fatores neurotróficos no desenvolvimento do sistema nervoso, interações entre o glutamato e fatores neurotróficos têm sido procuradas e encontradas. Na verdade, uma interação entre os sistemas de sinalização do glutamato e de fatores neurotróficos desempenha papel crucial na neuroplasticidade dependente da atividade durante o desenvolvimento e na idade adulta (Mattson, 2008). Neurônios e células gliais são produzidos por divisões assimétricas de auto-renovação das células progenitoras neurais (NPCs). Diferentes vias de sinalização estão envolvidas na determinação do destino dos

NPCs, incluindo aquelas ativadas por moléculas de adesão da matriz extracelular e de células, fatores de crescimento, citocinas e neurotransmissores (Edlund; Jessell, 1999; Lillien, 1998). O glutamato pode influenciar NPCs, direta ou indiretamente, estimulando a produção de fatores neurotróficos e outras moléculas sinalizadoras nos neurônios (Suzuki et al., 2006). O glutamato também pode estimular a neurogênese indiretamente induzindo a produção de fatores de crescimento, citocinas e outros mensageiros intercelulares em neurônios e células gliais (Lee et al., 2002). No entanto, há pouca informação sobre a presença destes mediadores e receptores no GT, bem como de que forma a lesão de nervos periféricos pode alterar a expressão destas moléculas no GT e de que forma a luz laser interage com o tecido modificando este complexo microambiente estabelecido pela lesão e como isto pode acarretar em melhora da sintomatologia dolorosa.

1.10 MEDIADORES DA DOR

Lesão tecidual pode levar a um quadro de hiperalgesia, este quadro é causado pela redução do limiar nociceptivo e pelo aumento da excitabilidade dos aferentes primários. Isto ocorre por que a lesão tecidual promove a liberação de diferentes substâncias bem como leva a ativação de receptores que contribuem para este quadro de sensibilização.

O receptor de potencial transiente vanilóide do subtipo 1 (TRPV-1) é altamente expresso em neurônios sensoriais primários de pequeno diâmetro no gânglio da raiz dorsal (DRG) e gânglio do trigêmeo (GT) (Tominaga, 2010). TRPV1 é relatado por estar envolvido na inflamação (Amaya et al., 2003), câncer (Asai et al., 2005; Shinoda et al., 2008) e dor neuropática (Fukuoka et al., 2002; Hudson et al., 2001; Rashid et al., 2003). Na dor orofacial, TRPV1 é relatado por estar envolvido na inflamação da polpa dentária (Chidiac et al., 2002; Tarsa et al., 2010), distúrbio temporomandibular (DTM) (Ro et al., 2009), câncer bucal (Nagamine et al., 2006) e dor relacionada à lesão do NAI (Kim et al., 2008). Estes resultados indicam que o TRPV1 participa da dor neuropática e pode estar envolvido na dor neuropática trigeminal. Além disso, a análise da expressão de TRPV1 pode contribuir para o desenvolvimento de fármacos terapêuticos e métodos para o tratamento da dor neuropática trigeminal. Sendo que, estudos revelaram que a administração de antagonistas do TRPV1 apresentam efeitos analgésicos tanto na dor inflamatória quanto neuropática (Pomonis et al., 2003; Walker et al., 2003).

Um estudo mostrou que a proporção de células imunorreativas para TRPV1 foi aumentada em grandes neurônios no TG em animais com ligação parcial do nervo infra-

orbital (Nlo). Estes resultados sugerem que a expressão de TRPV1 em grandes neurônios participou no desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia térmica da dor neuropática trigeminal (Urano et al., 2012).

Estudos tem relatado o papel do TRPV1 não somente como um sensor classicamente associado à transdução de estímulos térmicos potencialmente prejudiciais, que são percebidos como dolorosos, uma vez que é essencial para o desenvolvimento da hipersensibilidade térmica durante a inflamação, mas também tem sido implicada sua participação no desenvolvimento da dor neuropática induzida por lesão desde que mudanças na sua expressão têm sido observadas após a lesão de nervos periféricos e inflamação (Breese et al., 2005; Kanai et al., 2005; Luo et al., 2004; Obata et al., 2004).

Estas alterações podem ser atribuídas à própria lesão e / ou ao ambiente alterado encontrado por axônios em regeneração no local da lesão e / ou tecido alvo (Campana et al., 2006; Iwata et al., 2001; Kitagawa et al., 2006). Uma vez que, estudos têm demonstrado que certas lesões neuropáticas e doenças inflamatórias induzem a um aumento na expressão de receptores TRPV1 na medula espinal, fato que colabora para a sensibilização dos neurônios aferentes primários, contribuindo com casos de alodinia ou hiperalgesia (Hudson et al., 2001; Luo et al., 2004). Outro fator que pode levar à sensibilização do receptor TRPV1 e consequente geração de estados hiperalgésicos é a via de interação com receptores NK-1 para a substância P (SP) (Lin et al., 2007). Sendo que, estudos de imuno-histoquímica já demonstram que a SP e receptor NK1 são colocalizados com TRPV1 em neurônios do gânglio da raiz dorsal ou do trigêmeo (Bae YC et al., 2004; Zhang et al., 2007). A participação da SP no processo nociceptivo advém de estudos em animais, os quais mostraram quantidades alteradas de SP no tecido lesado (Sahbaie et al., 2009). Substância P é encontrada em altas concentrações nas terminações aferentes da medula espinal, sendo o mediador da primeira sinapse da dor. Estudos têm mostrado que a administração de SP produziu, em animais, o comportamento de coçar, morder e lambear, indicando nocicepção, e sugerindo que a SP possa ter papel estimulatório importante na via nociceptiva.

A SP é um neuropeptídeo que é liberado a partir de aferentes nociceptivos primários e está envolvido na nocicepção, no sistema nervoso central e no periférico. As ações biológicas da SP podem ser mediadas através da ativação de três diferentes receptores neurokinin (NK) denominados NK1, NK2 e NK3, mas os receptores NK1 demonstram uma afinidade preferencial para SP (Satake et al., 2013).

Além disso, a estimulação das fibras aferentes periféricas resultou na liberação de SP dentro do gânglio trigeminal, e essa liberação é grandemente aumentada após inflamação

orofacial (Neubert et al., 2000). Estes dados sugerem fortemente que a SP periférica desempenha um papel no processo nociceptivo trigeminal (Awawdeh et al., 2002; Bowles et al., 2003; Caviedes-Bucheli et al., 2006). No entanto, considerando a dor orofacial, poucos estudos têm demonstrado o envolvimento do sistema periférico SP/NK1 em hiperalgesia inflamatória e alodinia experimental (Denadai-Souza et al., 2009; Takeda et al., 2005a).

Outro componente importante no processamento nociceptivo é o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). O CGRP é amplamente expresso no caminho da dor trigeminal, tanto a nível periférico quanto central (Hansen; Ashina, 2014). Foi mostrado que a aplicação de CGRP, produz uma excitação lenta e prolongada em neurônios no corno dorsal, que evidencia que o CGRP tem um efeito sobre a atividade excitatória neuronal, o que implica que o CGRP pode promover a transmissão da informação nociceptiva no corno dorsal da medula espinal (Bird et al., 2006; Sun et al., 2004; Yu et al., 2002). Sendo que o CGRP pode facilitar a nocicepção por retardar o metabolismo da SP e, também, por aumentar a liberação de SP e de glutamato nas terminações centrais das fibras aferentes primárias (Oliveira et al., 2010).

1.11 MICROAMBIENTE DA LESÃO

Após a lesão do nervo existem várias respostas por parte do axônio, de células de apoio e do microambiente, antes da regeneração poder começar; gradientes tanto inibitórios quanto estimulatórios existem para fornecer sinais de orientação necessários para guiar o crescimento (Goldberg, 2000; Kapur; Shoichet, 2003). O ambiente que os axônios encontram distalmente ao local da lesão também é um fator determinante para a regeneração bem sucedida. Os fatores neurotróficos secretados pelas células de Schwann, ou órgãos alvo modulam a atração axonal e a criação de uma via favorável no coto distal do nervo que permite aos axônios em crescimento a aderir e alongar. A relação entre axônios e seu ambiente imediato é, portanto, essencial para determinar as capacidades intrínsecas para a regeneração e reinervação (Allodi et al., 2012).

Moléculas de adesão celular (MAC), moléculas da matriz extracelular (MCE) e as moléculas de orientação mantêm um papel importante durante a regeneração axonal, exercendo vias de atração / repulsão para a ponta do recrescimento axonal. Graças aos receptores presentes no local do cone de crescimento, os axônios podem responder às diferentes vias (Huber et al., 2003). Moléculas da MCE e células de Schwann (CS) são

componentes importantes da regeneração do nervo periférico (Platt et al., 2003). Moléculas da MEC fornecem apoio e ancoragem para as células e regulam a morfologia, migração e proliferação das células. CS contribuem para a regeneração axonal por secretarem moléculas da MEC tais como a laminina e colágeno, moléculas de adesão celular, e fatores tróficos incluindo neurotrofinas (Brushart, 2011). Lamininas desempenham um papel crucial na regulação da sinalização citoesquelética de CS e tem uma participação crítica para a proliferação de CS, além disso, a sua presença é essencial às células de Schwann para mielinizar os axônios com sucesso (Yu et al., 2009; Yu et al., 2007).

Tanto o meio extracelular, por meio do qual os axônios crescem, bem como a disponibilidade e ação de fatores neurotróficos desempenham papéis fundamentais na regulação do crescimento e regeneração axonal. Sendo que foi mostrado que parece haver uma convergência das vias de sinalização de NGF e integrinas ativadas e isto pode estar subjacente aos efeitos de reforço observados da laminina ou outras moléculas da MEC sobre respostas celulares dependentes de fatores de crescimento (Tucker et al., 2005). Outro estudo mostrou que a laminina é um substrato de plasmina que é clivada durante o crescimento de neurites induzido por NGF. Além disso, também se sugeriu que esta degradação é um importante mecanismo para facilitar o crescimento de neurites (Gutierrez-Fernandez et al., 2009).

O sucesso da regeneração do sistema nervoso periférico depende em grande parte da manutenção da lâmina basal, devido à remoção eficaz dos resíduos de mielina por macrófagos e células de Schwann. A expressão de fatores neurotróficos pelas células de Schwann, regula o programa de crescimento intrínseco nos neurônios do sistema nervoso periférico. Em casos de lesão axonal, inicialmente ocorre à degeneração Walleriana, seguida por brotamento axonal, formação de cones de crescimento neuronal que é dependente da ativação de cascatas complexas de sinalização, que envolve vários receptores (Beirowski et al., 2005; Lubinska, 1977).

A bainha de mielina é dependente da presença de moléculas altamente adesivas que mantém a membrana basal bem aderida ao axônio. A glicoproteína (Proteína zero – P0) é o principal componente do sistema nervoso periférico responsável pela formação da bainha de mielina nos mamíferos (Rotenstein et al., 2008).

Outro componente importante para a regeneração nervosa são os Neurofilamentos (NFs) que são filamentos intermediários neuronais, o mais abundante dos polímeros do citoesqueleto estrutural de axônios mielinizados de vertebrados, sendo sua expressão restrita a células neuronais. NFs influenciam tanto a morfologia quanto a fisiologia dos axônios e

determinam o calibre do axônio, promovendo o crescimento axonal em longas distâncias (Perrot et al., 2008; Walker et al., 2001). A expressão altamente regulada de proteínas de NFs, durante o crescimento axonal sugere que NFs são importantes para o desenvolvimento do axônio, um estudo mostrou que a perda de NFs pode alterar um parâmetro específico da dinâmica de crescimento de neurite (Walker et al., 2001). Sendo que os resultados de um estudo no qual as células foram transfectadas com uma codificação de construção de proteína verde fluorescente (GFP) conjugados subunidades NF-M indicou que os cones de crescimento contem uma população de subunidades recém-sintetizadas de NF que podem participar na remodelação do citoesqueleto regional (Chan et al., 2003).

Portanto, é importante aprofundar a compreensão das interações moleculares entre os fatores neurotróficos, seus receptores, moléculas de adesão e os elementos da matriz extracelular no processo regenerativo. Estas interações estão envolvidas na quimiotaxia celular, migração e alongamento axonal, e suas vias de sinalização pode promover a sobrevivência celular ou a apoptose (Allodi et al., 2012).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar por meio das técnicas de *immunoblotting* a expressão de fatores neurotróficos (NGF e BDNF), de TRPV1, de SP, de CGRP e de moléculas do microambiente da lesão, como a laminina, proteína mielínica zero e neurofilamentos em um modelo de lesão do nervo alveolar inferior e por meio de microscopia eletrônica demonstrar a morfologia do nervo alveolar inferior antes e após a aplicação de laser de baixa intensidade. Além da avaliação da expressão de receptores glutamatérgicos (GluR1 e GluR2) no gânglio trigeminal destes animais. Bem como avaliar a sensibilidade dolorosa dos animais antes e após aplicação da laserterapia. Para o desenvolvimento deste projeto, as seguintes etapas foram realizadas:

- a) Padronização dos procedimentos cirúrgicos para indução da neuropatia trigeminal e dos procedimentos de laserterapia em ratos;
- b) Avaliação da sensibilidade dolorosa dos animais antes e após da indução da neuropatia trigeminal, e após o tratamento de laserterapia, utilizando modelo de alodinia mecânica (conforme descrito em detalhes na metodologia do trabalho);
- c) Determinação da expressão do NGF, BDNF no NAI, dos diferentes grupos experimentais, por meio da técnica de Western Blotting;
- d) Determinação da expressão dos receptores para glutamato (GluR1 e GluR2) no GT, por meio de ensaios de Western Blotting;
- e) Avaliação temporal da expressão dos receptores para glutamato (GluR1 e GluR2) no GT, por meio de ensaios de Western Blotting;
- f) Avaliação da expressão das proteínas TRPV1, SP e CGRP no GT por meio da técnica de Western Blotting;
- g) Determinação da expressão de laminina, P0 e neurofilamentos no NAI, por meio de ensaios de Western Blotting;
- h) Avaliação morfológica do NAI após a lesão e após o tratamento de laserterapia;
- i) Realização de estágio de curta duração na Universidade de Toronto, com o Professor Dr. Barry Sessle. (vide Anexo A)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos Wistar, pesando entre 200-220 g. Os animais foram cedidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas- ICB/ USP e mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia, do mesmo Instituto. Todos os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada, com isolamento acústico, temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ciclo claro/escuro (12/12 h). Os animais foram acondicionados em gaiolas com cinco animais cada de acordo com os grupos experimentais. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB (protocolo número 150/10 - número do livro 02/2010). Para a realização dos experimentos, os animais foram manipulados considerando os princípios e o guia de uso de animais de laboratório envolvendo dor e nocicepção (Zimmermann, 1983).

3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA INDUÇÃO DE DOR NEUROPÁTICA

A técnica cirúrgica utilizada neste projeto foi adaptada de Rehak (1963), na qual os animais foram anestesiados profundamente com quetamina (20 mg/100 g de peso corporal, ip) e xilazina (2 mg/100 g de peso corporal, ip). O monitoramento anestésico foi avaliado por meio da presença ou ausência de determinados sinais como reflexo da pata, reflexo palpebral e das alterações das frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR), que sofrem modificações de acordo com os planos atingidos (profundidade da anestesia). Seguiu-se a assepsia com iodo-povidine. Os animais foram colocados sob um ponto de luz forte posicionado para cair no lado lateral da cabeça do rato (Fig. 3a). Uma incisão vertical foi feita em uma linha entre os cantos da boca e do canto lateral dos olhos. A incisão foi colocada a meio caminho entre estes pontos e teve 1 cm de comprimento (Fig. 3b). Sobrejacentes ao músculo masseter, encontramos dois nervos - o nervo bucal e nervo marginal da mandíbula, ramos do nervo facial - que foram usados como pontos de referência. Uma pinça foi colocada diretamente sob o mais alto dos dois nervos transversais, e o final do osso basal do incisivo foi gentilmente palpado (Fig. 3c). Pinças foram colocadas nesta área de separação para manter as seções do músculo distante. As fibras musculares foram divulsionadas do periósteo mandibular na região superior ao incisivo, perto da extremidade

basal. O nervo alveolar inferior foi observado (Fig. 3c). Uma broca diamantada do tipo esférica foi utilizada para realizar o acesso ao NAI (Fig. 3d). O nervo pôde ser levantado a partir do canal mandibular e uma pequena pinça (pinça hemostática Crile, segundo dente da cremalheira, mantida em posição por 30 segundos) foi usada para fazer o esmagamento do nervo simulando a situação que pode acontecer durante a extração de um dente terceiro molar inferior (Fig. 3e). Esse tipo de lesão é denominada axonotmese (Lent, 2004). As fibras musculares foram reaproximadas e a incisão foi suturada (3f). Cabe mencionar que foi utilizado, como controle, um grupo de animais falso-operados (sham), ou seja, sem o esmagamento do nervo. Todos os procedimentos foram aprovados pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da Universidade de São Paulo (protocolo número 150 - número do livro 02/2010). Os animais foram recolocados na gaiola e observados até o momento em que despertaram sendo então levados novamente ao biotério.

Figura 3 – Sequência do procedimento para lesão do nervo alveolar inferior. Em **a** temos o animal em decubito lateral esquerdo após tricotomia da região da face do lado direito; Em **b** temos a incisão feita; Em **c** vemos a mandíbula após separação das bordas da incisão, os músculos sendo afastados e mantidos em posição e também visualizamos o trajeto do NAI; Em **d** vemos a broca cirúrgica esférica utilizada para realizar o acesso ao NAI; Em **e** vemos o NAI após acesso através da mandíbula e o seu esmagamento com uma pinça; E em **f** vemos o aspecto final do procedimento com sutura das estruturas. Adaptado de Rehak (1963). FONTE: Rehak (1963). (Cirurgia realizada no Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor).

3.3 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOLOROSA

Em todos os testes comportamentais os ratos foram inicialmente habituados por trinta minutos, durante três dias que antecederam o primeiro experimento, e nos dias dos ensaios, por 10 minutos antes do início dos mesmos. Sendo que todos os testes foram realizados em “duplo cego”. Cabe mencionar que todos os testes comportamentais foram realizados antes de cada sessão de laserterapia, ou seja, avaliando-se o efeito da sessão anterior.

Os testes foram aplicados antes do procedimento cirúrgico (para obtenção da medida inicial), após 2 dias da lesão (para avaliar se o procedimento cirúrgico da lesão do nervo alveolar inferior induziu a alodinia mecânica) e ao longo do tratamento com laserterapia (com a finalidade de avaliar se este tratamento é ou não eficaz na melhora da resposta nociceptiva).

3.3.1 ALODINIA MECÂNICA

A determinação da alodinia mecânica foi avaliada por ensaio quantitativo, em resposta a estímulo tátil aplicado à pele ao redor da mandíbula, segundo método descrito por Chaplan (1994) e Yonehara (2003), modificados (Chaplan, 1994; Yonehara et al., 2003). Neste teste, os ratos foram colocados, individualmente, em caixas de acrílico com tampa, com pequenas aberturas e base aberta. A caixa de acrílico fica sobre uma grade, que mede 1 metro de comprimento por 45 cm de largura, com espaço entre os arames de 1 cm. A grade fica fixada na parede a dois metros do chão, para permitir acesso à região facial destes animais. Cada filamento de von Frey foi aplicado duas vezes na superfície da pele em torno da mandíbula inferior direita, por um tempo máximo de 10 segundos, com cerca de 5 segundos em intervalos. As respostas foram consideradas quando os ratos retiraram a cabeça ou quando eles tocaram ou arranharam as regiões faciais após os filamentos de von Frey serem aplicados. Para o ensaio de alodinia, foi empregada uma série logarítmica de 10 filamentos de von Frey (Aesthesiometer Semmes-Weinstein, Stoelting Co., EUA) (Figura 4). O filamento capaz de induzir o rato a retirar a cabeça, tocar ou arranhar as regiões faciais, duas vezes consecutivas, foi considerado como a força em gramas necessária para induzir a resposta (100% de resposta).

Os filamentos e seus valores respectivos em gramas são: 2.83 (0.070 g); 3.22 (0.160 g); 3.61 (0.407 g); 3.84 (0.692 g); e 4.08 (1.202 g). Os resultados foram avaliados por meio de comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

Figura 4 – Ilustração do teste de estimulação tátil – Filamentos de Von Frey

FONTE: Laboratório de neuroanatomia funcional da dor. Departamento de Anatomia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

3.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E APLICAÇÃO DO LASER PÓS-LESÃO DO NAI EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos inicialmente em quatro grupos, sendo que dois grupos foram irradiados com laser de GaAs (Arseneto de Gálio, Laserpulse-Laser Ibramed) emitindo um comprimento de onda de 904 nm, potência de saída de 70 Wpk, com uma área de saída por ponto de cerca de $0,1 \text{ cm}^2$, com frequência de 9500 Hz, tempo de pulso de 60 ns e uma densidade de energia de 6 J/cm^2 (Todos os parâmetros do laser utilizado neste estudo encontram-se na **Tabela 1**). E os outros dois não sofreram aplicação do laser. Conforme descrito a seguir.

Grupo 1 foi formado por animais que sofreram a lesão no nervo e tratamento com o laser (Oper+Laser);

Grupo 2 foi formado por animais falso-operados (FOP) e tratamento com o laser (FOP+Laser);

Grupo 3 foi formado por animais operados, porém sem aplicação do laser (Oper);

Ainda, adicionamos um grupo naíve (“branco”) para controle, Grupo 4 (naíve).

O tratamento com o laser foi realizado a cada dois dias, totalizando 10 sessões. Os animais foram irradiados com 6 J/cm^2 , durante 18 segundos por ponto, sendo irradiado um ponto próximo a articulação temporomandibular, ponto de entrada do nervo no canal mandibular, três pontos na região de corpo da mandíbula e um ponto na região do mento. Cada ponto foi irradiado com intervalos de 30 segundos, e cada sessão teve a duração total de

4 min. Após a 10ª sessão, os animais foram eutanaziados para obtenção de material que foi analisado por *immunoblotting*. Outro grupo foi perfundido transcárdicamente para obtenção de material para análise por microscopia eletrônica.

TABELA 1- ESPECIFICAÇÕES SOBRE OS PARÂMETROS DO LASER

INFORMAÇÕES DO APARELHO	
Fabricante	IBRAMED
Identificação do modelo	LASERPULSE Diamond
Tipo emissor	GaAs
PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO	
Comprimento de onda [nm]	904 nm
Modo de operação	Pulsado
Frequência [Hz]	9500 Hz
Duração do pulso [segundos]	60 ns
Forma do feixe	Circular
PARAMETROS PARA O TRATAMENTO	
Tamanho do feixe no ponto alvo [cm ²]	0.1 cm ²
Tempo de exposição [segundos]	18 segundos
Exposição radiante [J/cm ²]	6 J/cm ²
Energia radiante [J]	6 J
Número de pontos irradiados	5
Área irradiada [cm ²]	0.5 cm ²
Técnica de aplicação	Sem contato com a pele
Número e frequência de sessões do tratamento	10 sessões, realizadas a cada dois dias
Energia radiante total [J]	30 J por sessão, 300 J ao total das sessões

Tabela 1 - Tabela que inclui os mais importantes parâmetros do laser como parâmetros sobre feixe de luz, dose utilizada e técnica de aplicação. De acordo com Jenkins et al. 2011 (Jenkins, 2011).

3.5 ANTICORPOS UTILIZADOS

A relação de anticorpos que foram utilizados encontra-se na Tabela 2. Todos os anticorpos relacionados têm sido rotineiramente testados em nosso laboratório e estão disponíveis comercialmente.

TABELA 2 ANTICORPOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE IMUNOHISTOQUÍMICA E IMMUNOBLOTTING E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES

Proteína Método	Animal de origem	<i>Immunoblotting</i>
Policlonal anti-BDNF (AB-17779SP-Millipore Corportion)	Coelho	1:1000
Monoclonal anti-NGF (SC-32300; Santa Cruz – Biotechnology, INC.)	Camundongo	1:1000
Policlonal anti-Glur 1 e 2 (Chemicon, Temicula, CA)	Coelho	1:1000
Monoclonal anti-neurofilamento (Zymed – San Francisco, CA.)	Camundongo	1:200
Policlonal anti-Myelin Protein Zero (ab31851 Abcam INC.)	Coelho	1:1000
Monoclonal anti-Laminina (Sigma – Saint Louis)	Coelho	1:1000
Monoclonal anti-Substancia P (Millipore, Temecula California)	Coelho	1:1000
Policlonal anti-CGRP (ab47027 Abcam INC.)		
Monoclonal anti-TRPV1 (Chemicon, Canada)	Coelho	1:1000
Monoclonal Anti-β-Actina (Sigma – Saint Louis)	Camundongo	1:10000
HRP anti-camundongo (Amershan Biosciences – Buckinghamshire, UK)	Coelho	1:5000
HRP anti-coelho (Amershan Biosciences – Buckinghamshire, UK)	Camundongo	1:5000
HRP anti-rato (Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, PA)	Coelho	1:5000

3.6 ENSAIOS DE WESTERN BLOTTING

Cabe mencionar que inicialmente, os animais foram utilizados nos testes comportamentais e após seu término, os mesmos foram eutanaziados (utilizando guilhotina), e o nervo alveolar inferior e o gânglio do trigêmeo foram retirados. Foi utilizado somente o lado experimental de cada animal. Foi necessário um número maior de animais para os ensaios de immunoblotting devido ao gânglio do trigêmeo e a porção do NAI serem bem pequenos e haver necessidade da utilização de um “pool” de animais para obter quantidade de amostra suficiente para quantificação de proteínas.

O conteúdo proteico do material isolado dos animais foi dosado pelo método de Bradford (Amresco, U.S.A) (Bradford, 1976). Após a quantificação de proteína total pelo método de Bradford, as amostras foram submetidas à eletroforese por SDS-PAGE. Os materiais foram diluídos em um mesmo volume de tampão Tris/HCl 125 mM, pH 6,8, contendo 2,5% (p/v) de SDS, 2,5% de 2-mercaptoetanol (2-ME), 4 mM de EDTA e 0,05% de azul de bromofenol, e as amostras foram posteriormente fervidas em banho maria por 5 min. As amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 10% e submetido a eletroforese com corrente contínua de 120 V. Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, 0,2 µm de diâmetro) de acordo com a técnica descrita por Towbin et al., (1979) (Towbin et al., 1979). Os antígenos presentes na membrana de nitrocelulose foram submetidos à caracterização imunoenzimática. Após bloqueio com leite desnatado (Molico, Nestlé) 5% em tampão Tris-Salina (Tris 10 mM e NaCl 0,15 M, pH 7,5), por 1 hora, as membranas foram incubadas com anticorpos mono e policlonais específicos (para consulta veja Tabela 2). Os anticorpos foram diluídos em solução bloqueadora, por 18 horas a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas com Tris-Salina e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário marcado com peroxidase (goat anti rabbit HRP IgG (1:10.000; Chemicon), diluído a 1:5000 em solução bloqueadora. O excesso foi removido com mais um ciclo de lavagens com Tris-Salina. A β-actina foi utilizada como controle interno da reação (monoclonal mouse anti- β-actina [1:10.000] - Sigma, USA). As membranas foram reveladas utilizando o Kit ECL (Amersham Biosciences, NJ/EUA) de quimiluminescência e foram analisadas quanto à densidade óptica das bandas marcadas, utilizando o programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD/EUA). A análise dos dados foi feita pela média das diferenças percentuais entre os diferentes grupos experimentais.

3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DO NAI

Para a microscopia eletrônica de transmissão, os animais foram anestesiados via intraperitoneal, com quetamina (20 mg/100 g de peso corporal, ip) e xilazina (2 mg/100 g de peso corporal, ip), perfundidos com a solução fixadora Karnovsky modificada, contendo glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em solução tampão fosfato de sódio a 0,1M e pH = 7,4 de acordo com o método utilizado por Ciena et. al., 2012 (Ciena et al., 2012). Após a dissecação dos músculos da região da face, e acesso ao canal mandibular o NAI direito foi coletado. As amostras foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% a 4 °C e posteriormente imersas em solução aquosa de acetato de uranila 5% em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série crescentes de álcoois, imersas em óxido de propileno e incluídas em resina Spurr. Cortes semi-finos foram realizados no ultra-micrótomo Reichert Ultra Cut® e corados com a solução de azul de toluidina 1%, para verificação da área a ser analisada. Posteriormente, foram realizados os cortes ultra-finos de 60 nm, coletados em telas de cobre de 200 "mesh" (Sigma®) e contrastados com a solução de acetato de uranila 4% e solução aquosa de citrato de chumbo 0,4% conforme foi relatado por Watanabe e Yamada (1983) (Watanabe; Yamada, 1983). As telas foram examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1010, do Departamento de Anatomia da Universidade de São Paulo.

3.8 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em grupos experimentais e as sessões de laserterapia foram iniciadas 2 dias após a lesão do nervo alveolar. Este protocolo foi baseado tanto na prática clínica de aplicação do laser quanto na literatura (Iwata et al., 2001). O grupo sham passou pelo mesmo procedimento cirúrgico, no entanto não sofreu a lesão do nervo, este grupo foi usado como controle, para mostrar que o procedimento cirúrgico em si não foi capaz de induzir alteração; o grupo naive não passou por nenhum procedimento, utilizado como controle absoluto. Sendo n=5 para a técnica de western blotting.

Os animais foram eutanaziados após o término do tempo equivalente a dez sessões de laserterapia.

Também adicionamos um grupo, do qual coletamos material em diferentes períodos do tratamento (2 dias pós lesão e após a 5ª sessão com e sem tratamento com laser) para o estudo temporal da expressão dos receptores para glutamato no gânglio do trigêmeo.

3.9 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para o teste comportamental os dados foram representados como média $\pm$ e.p.m. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software Inc., CA, USA). A comparação estatística entre os grupos foi realizada usando a análise de variância de duas vias (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni. O índice de significância foi de $p < 0,05$.

Para os ensaios de *immunoblotting* a intensidade das bandas reativas formadas foi quantificada por densitometria óptica (Scion Image – Release Beta 3b, NIH, USA) e corrigidas pela densidade observada para a β -actina, considerando-se as amostra dos animais controle como o padrão para a normalização dos resultados. A análise estatística para a imunorreatividade das bandas reveladas foi realizada por meio de análise de variância de duas vias com pós-teste de Tukey com o uso do software GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software Inc., CA, USA). O índice de significância foi de $p < 0.05$ (Sokal, 1981).

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA LASERTERAPIA SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA LESÃO DO NERVO ALVEOLAR INFERIOR

4.1.1 EFEITO NA ALODINIA TÁTIL

Em nosso estudo vimos que após a lesão do nervo alveolar inferior (Op) houve diminuição do limiar de alodinia, quando comparado à medida inicial, ao naïve e ao falso-operado com laserterapia (sham + laser) (figura 5). Foi observada reversão total do limiar nociceptivo dos animais tratados com laser a partir da 2ª sessão de laser e se manteve até a décima sessão analisada. Animais controles, sham + laser e naïve, não apresentaram diferença em relação à medida inicial e ao longo das sessões. Cabe mencionar, que avaliamos animais sham, sem nenhum tratamento e sham, com tratamento de laser (sham+ laser), os quais não demonstraram diferenças entre si, portanto, para deixar mais objetiva a disposição dos dados no gráfico e pensando em reduzir o número de animais utilizados em nosso estudo optamos por usar somente o grupo sham + laser.

Figura 5 - Efeito da aplicação de laser de baixa intensidade sob a resposta nociceptiva (estimulação tátil) nos ratos com lesão no nervo alveolar inferior.

O limiar de alodinia, avaliado pelo teste de Von Frey, expresso em gramas, foi avaliado antes (MI) de qualquer procedimento, 2 dias (2 d) após lesão e após sessões com laser de baixa intensidade (s). Os resultados apresentam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ em comparação com os demais grupos. # $p < 0,001$ em comparação a medida inicial.

4.2 ENSAIOS DE WESTERN BLOTTING

Uma vez que os resultados do teste comportamental demonstraram que a lesão do nervo alveolar inferior foi capaz de inibir o limiar nociceptivo dos animais (gerando um quadro de dor trigeminal) e após as sessões de laserterapia este quadro se reverteu. Sabendo que estudos avaliando o sistema trigeminal têm demonstrado mudanças na expressão de neuropeptídeos, receptores e canais iônicos no GT após a lesão do NAI, passamos para a avaliação dos possíveis mediadores deste processo por meio de ensaios de *western blotting*. Demonstrando o envolvimento das neurotrofinas (NGF e BDNF) no nervo alveolar inferior (lado experimental – ipsilateral a lesão) e dos receptores para glutamato (GluR1 e GluR2) no gânglio trigeminal (lado experimental – ipsilateral a lesão), também avaliamos a proteína estrutural laminina, a proteína mielínica zero e os neurofilamentos (lado experimental – ipsilateral a lesão) no nervo alveolar inferior após tratamento com o protocolo de laserterapia. Para melhor visualização dos resultados, os valores foram transformados em porcentagem, considerando a média do grupo naive como 100%.

4.3 EFEITO SOBRE AS NEUROTROFINAS NGF E BDNF

Observamos um aumento de aproximadamente 30% na densidade óptica das bandas marcadas para NGF no NAI no grupo de animais operados (Op) quando comparado com o grupo controle (naive). Após as 10 sessões de laserterapia no grupo Op + laser foi observado um aumento de aproximadamente 53% quando comparado com as bandas do grupo naive.

Ainda, não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado (sham + laser – também utilizado como controle) em relação ao naive. A densidade média para o grupo controle naive foi considerada 100% (Figura 6).

Nos resultados de *immunoblotting* para BDNF, podemos observar um aumento de aproximadamente 30% na densidade óptica das bandas marcadas para BDNF no NAI no grupo de animais operados (Op) quando comparado com o grupo controle (naive). Após as 10 sessões de laserterapia no grupo Op + laser foi observado uma diminuição de aproximadamente 40% quando comparado com as bandas do grupo naive.

Também não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado (sham + laser – também utilizado como controle) em relação ao naive. A densidade média para o grupo controle naive foi considerada 100% (Figura 7).

Figura 6- Efeito da laserterapia sobre a neurotrofina NGF.

Expressão da neurotrofina NGF no nervo alveolar inferior. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo naive e sham+laser; ** $p < 0.001$ em comparação ao grupo op.

Figura 7- Efeito da laserterapia sobre a neurotrofinas BDNF.

Expressão da neurotrofina BDNF no nervo alveolar inferior. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com os grupos controle (naive e sham+laser) e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo Op.

4.4 EFEITO SOBRE MEDIADORES NOCICEPTIVOS

4.4.1 EFEITO SOBRE A EXPRESSÃO DE TRPV-1

Nos resultados de *immunoblotting* para TRPV-1 (n=5), podemos observar um aumento na densidade óptica das bandas marcadas para TRPV-1 no GT no grupo de animais operados (Op) quando comparado com o grupo controle (naive). Após as 10 sessões de laserterapia no grupo Op + laser foi observado uma diminuição na expressão de TRPV-1, de aproximadamente 23%, quando comparado com as bandas do grupo naive.

Ainda, não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado (sham + laser – também utilizado como controle) em relação ao naive. A densidade média para o grupo controle naive foi considerada 100% (Figura 8).

Figura 8- Efeito da laserterapia sobre a expressão de TRPV-1.

Expressão de TRPV-1 no gânglio trigeminal. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo * $p < 0,05$ comparado aos grupos controles (naive e sham+laser) e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo Op.

4.4.2 EFEITO SOBRE A EXPRESSÃO DE SP

Nos resultados de *immunoblotting* para SP (n=5), podemos observar um aumento na densidade óptica das bandas marcadas para SP no GT no grupo de animais operados (Op) quando comparado com o grupo controle (naive). Após as 10 sessões de laserterapia no grupo Op + laser foi observado uma diminuição na expressão de SP, de aproximadamente 10%, quando comparado com as bandas do grupo naive.

Ainda, não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado (sham + laser – também utilizado como controle) em relação ao naive. A densidade média para o grupo controle naive foi considerada 100% (Figura 9).

Figura 9- Efeito da laserterapia sobre a expressão de SP.

Expressão de SP no gânglio trigeminal. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo ** $p < 0,05$ comparado aos grupos controles (naive e sham+laser) e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo Op.

4.4.3 EFEITO SOBRE A EXPRESSÃO DE CGRP

Nos resultados de *immunoblotting* para CGRP (n=5), podemos observar que não houve alterações significativas na densidade óptica das bandas marcadas para CGRP no GT comparando o grupo de animais operados (Op) com os grupos controles (naive e sham + laser). Após as 10 sessões de laserterapia no grupo Op + laser foi observado uma diminuição na expressão de CGRP, de aproximadamente 16%, quando comparado com as bandas dos demais grupos.

Ainda, não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado (sham + laser – também utilizado como controle) em relação ao naive. A densidade média para o grupo controle naive foi considerada 100% (Figura 10).

Figura 10- Efeito da laserterapia sobre a expressão de CGRP.

Expressão de CGRP no gânglio trigeminal. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo, * $p < 0,05$ comparado com os demais grupos.

4.5 EFEITO SOBRE OS RECEPTORES PARA GLUTAMATO

Nos resultados de *immunoblotting* para GluR1 (n=5), podemos observar um aumento na densidade óptica das bandas marcadas para GluR1 no GT no grupo de animais operados (Op) quando comparado com o grupo controle (naive). Após as 10 sessões de laserterapia no grupo Op + laser foi observado um maior aumento, de aproximadamente 53%, quando comparado com as bandas do grupo naive.

Ainda, não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado (sham + laser – também utilizado como controle) em relação ao naive. A densidade média para o grupo controle Naive foi considerada 100% (Figura 11).

Nos resultados de *immunoblotting* para GluR2 (n=5), podemos observar uma diminuição na densidade óptica das bandas marcadas para GluR2 no GT no grupo de animais operados (Op) quando comparado com o grupo controle (naive). Após as 10 sessões de laserterapia no grupo Op + laser foi observado um maior aumento na expressão da proteína de aproximadamente 15% quando comparado com as bandas do grupo naive.

Não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado (sham + laser – também utilizado como controle) em relação ao naive. A densidade média para o grupo controle naive foi considerada 100% (Figura 12).

Figura 11- Efeito da laserterapia sobre o receptor para glutamato 1.

Expressão do receptor para glutamato 1 (GluR1) no gânglio trigeminal. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo*** $p < 0,001$ comparado com os demais grupos.

Figura 12- Efeito da laserterapia sobre o receptor para glutamato 2.

Expressão do receptor para glutamato 2 (GluR2) no gânglio trigeminal. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo* $p < 0,05$ comparado com os demais grupos.

4.6 EFEITO SOBRE OS RECEPTORES PARA GLUTAMATO (AVALIAÇÃO TEMPORAL)

Analizados os resultados para os receptores para glutamato, resolvemos coletar material para análise em diferentes períodos do tratamento para avaliar se havia alterações destas proteínas ao longo do período avaliado, e como seria a curva temporal de expressão destes receptores dentro do nosso protocolo, assim, coletamos material 2 dias após a lesão (data na qual iniciamos o tratamento) e após completar 5 sessões (10 dias), com tratamento e sem tratamento (na metade do tempo de tratamento). Os resultados não mostraram nenhuma tendência de variação em relação aos experimentos realizados com material coletado após o término do tratamento (10 sessões – 20 dias) para ambos receptores de glutamato analisados GluR1 (Figura 13) e GluR2 (Figura 14).

Figura 13- Efeito temporal da laserterapia sobre o receptor para glutamato 1.

Expressão do receptor para glutamato 1 GluR1 no gânglio trigeminal, em diferentes fases do tratamento. 2 d, 10 d e 20 d referentes a 2, 10 e 20 dias após a lesão sem tratamento. 10 d, 20 d + La referentes a 10 e 20 dias após a lesão e tratamento com laser (representando a 5ª e 10ª sessão, respectivamente). Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo * $p < 0,05$ comparado com os demais grupos.

Figura 14- Efeito temporal da laserterapia sobre o receptor para glutamato 2.

Expressão de GluR2 no gânglio trigeminal, em diferentes fases do tratamento. 2 d, 10 d e 20 d referentes a 2, 10 e 20 dias após a lesão sem tratamento. 10 d, 20 d + La referentes a 10 e 20 dias após a lesão e tratamento com laser (representando a 5ª e 10ª sessão, respectivamente). Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo* $p < 0,05$ comparado com os demais grupos.

4.7 EFEITO SOBRE O MIROAMBIENTE DA LESÃO

4.7.1 EFEITO SOBRE A PROTEÍNA ESTRUTURAL LAMININA

Nos resultados de *immunoblotting* para laminina (n=5), utilizando o nervo alveolar dos animais, podemos observar um aumento de aproximadamente 45% na densidade óptica das bandas marcadas para laminina no NAI no grupo de animais operados (Op) quando comparado com o grupo controle (naive). Após as 10 sessões de laserterapia no grupo Op + laser foi observado uma diminuição na expressão da proteína de aproximadamente 22% quando comparado com as bandas do grupo naive.

Também não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado (sham + laser – também utilizado como controle) em relação ao naive. A densidade média para o grupo controle Naive foi considerada 100% (Figura 15).

Figura 15- Efeito da laserterapia sobre a proteína estrutural laminina.

Expressão de laminina no nervo alveolar inferior de ratos. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo * $p < 0,05$ comparado com os grupos usados como controle (grupo naive e sham+laser); ** $p < 0,001$ em comparação ao grupo Op.

4.7.2 EFEITO SOBRE A PROTEÍNA MIELÍNICA ZERO (P0)

Nos resultados de *immunoblotting* para P0 (n=5), utilizando o nervo alveolar dos animais, podemos observar um aumento de aproximadamente 20% na densidade óptica das bandas marcadas para P0 no NAI no grupo de animais operados (Op) quando comparado com o grupo controle (naive).

Após as 10 sessões de laserterapia no grupo Op + laser foi observado uma diminuição na expressão da proteína de aproximadamente 74% quando comparado com as bandas do grupo naive.

Também não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado (sham + laser – também utilizado como controle) em relação ao naive. A densidade média para o grupo controle Naive foi considerada 100% (Figura 16).

Figura 16- Efeito da laserterapia sobre a proteína mielínica zero.

Expressão de P0 no nervo alveolar inferior de ratos. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo * $p < 0,05$ em comparação com o grupo naive e sham+laser; *** $p < 0.0001$ em comparação aos demais grupos.

4.7.3 EFEITO SOBRE NEUROFILAMENTOS

Nos resultados de *immunoblotting* para NFs (n=5), utilizando o nervo alveolar dos animais, podemos observar alterações na expressão de NFs, em especial do NF-H, no NAI no grupo de animais operados (Op) quando comparado com o grupo controle (naive). Após as 10 sessões de laserterapia no grupo Op + laser foi observado uma diminuição na expressão de NF-H quando comparado com as bandas do grupo naive.

Não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado (sham + laser – também utilizado como controle) em relação ao naive. A densidade média para o grupo controle Naive foi considerada 100% (Figura 17).

Figura 17- Efeito da laserterapia sobre a neurofilamentos.

Expressão de neurofilamentos no nervo alveolar inferior de ratos. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. ** $p < 0.001$ comparado aos demais grupos.

4.8 EFEITO SOBRE A REGENERAÇÃO DO NAI

Análise de microscopia eletrônica mostrou que no grupo controle (naive) o NAI apresentava a morfologia dos axônios e células de Schwann normais (Figura 18A-B). No grupo Op (20 dias após a lesão), a bainha de mielina foi seriamente danificada. Vacuolização ocorreu no citoplasma axonal (Figura 18C-D). No entanto, a bainha de mielina danificada cresceu e os axônios e células de Schwann exibiam morfologia normal após o tratamento com LBI durante 20 dias no grupo Op + laser (Figura 18E-F). Além disso, analisou-se a densidade das fibras nervosas mielinizadas nos diferentes grupos e observamos que o tratamento com laser de baixa intensidade aumentou significativamente a densidade das fibras nervosas mielinizadas após os 20 dias de tratamento, no grupo Op + laser em relação ao grupo Op (Figura 19). Além disso, para medir os dados morfométricos de interesse (médias) a quantificação relativa das imagens de microscopia eletrônica foi feita. A análise morfométrica foi feita a partir de cortes da porção distal do nervo dos animais para os diferentes grupos. Foi avaliada: Diâmetro da fibra nervosa, diâmetro do axônio e a espessura da bainha de mielina, respectivamente para os grupos controle, Op e Op + laser. O G-ratios também foi calculado dividindo-se o diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra (Tabela 3).

Figura 18 - Microscopia eletrônica de transmissão do nervo alveolar inferior.

Microfotografias de microscopia eletrônica de transmissão do NAI. A morfologia ultra-estrutural do NAI foi observada em diferentes grupos. Imagens representativas são mostradas. **A** e **B** - fibras intactas, mostrando distribuição regular de fibras amielínicas e mielínicas; **C** e **D** - NAI após 20 dias da lesão, a estrutura do nervo foi severamente danificada, caracterizada pela degeneração Walleriana, mostrando degeneração axonal; **E** e **F** - NAI após 20 dias de lesão e tratamento com laser de baixa intensidade, revelou fibras amielínicas e mielínicas regeneradas e o processo de regeneração. As setas (→) destacam a bainha de mielina em **A** e **B** (grupo controle) demonstrando uma bainha de mielina mais espessa e bem disposta em comparação com o grupo Op (**C-D**) e em **F-E** os efeitos da LBP para a regeneração da fibra do nervo da bainha de mielina, a espessura mostrou diferença significativa com o grupo Op. Pontas de seta (▶) destacam o núcleo da célula de Schwann, demonstrando o processo de regeneração. Barras de escala: **A**, **C** e **E**: 10 µm; **B**, **D** e **F**: 2 µm.

TABELA 3. DADOS MORFOMÉTRICOS DO NAI

Grupos	Diâmetro da Fibra nervosa	Diâmetro do Axônio	Espessura da Bainha de Mielina	G-ratios
Controle	6.68	4.25	1.2	0.63
Op	3.21	2.12	0.34	0.66
Op + laser	4.80	2.78	0.49	0.58

Diâmetro da fibra nervosa, diâmetro do axônio e a espessura da bainha de mielina - Parâmetros morfométricos que refletem a maturação axonal. O G-ratios também foi calculado dividindo-se o diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra. Os dados mostram que o tratamento promoveu a recuperação do diâmetro das fibras e dos axônios regenerados, bem como da espessura das bainhas de mielina.

5 DISCUSSÃO

Lesões traumáticas dos nervos periféricos são frequentes e podem ser causadas por diferentes fatores, como por exemplo, ferimentos penetrantes, esmagamento, tração, isquemia, choque elétrico, fraturas, percussão, vibração, entre outras causas (Shakur et al., 2011).

Após a lesão, o microambiente local sofre uma série de mudanças neuroquímicas e neuroanatômicas nos neurônios (Burnett; Zager, 2004). Outra alteração é a sensibilização de nociceptores que acarretarão em dor (Brennan, 2005). A dor neuropática, secundária a lesões traumáticas de nervo periférico, é caracterizada por hipersensibilidade do sistema nervoso central e periférico e necessita de tratamento farmacológico específico (Attal et al., 2010; Dworkin et al., 2003). Muitas vezes, esse tratamento é ineficaz e/ou está associado à presença de efeitos colaterais (Kuhlein et al.). Vários estudos experimentais têm sido desenvolvidos na tentativa de melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos da regeneração nervosa e suas complicações, além de buscarem um tratamento que apresente resultados melhores do que os atualmente existentes, entre os quais podemos citar o laser de baixa intensidade (Andraus R, 2010; Bae CS et al., 2004; Barbosa et al., 2010; Ferreira et al., 2005).

Nossos resultados com os testes comportamentais indicaram que após a lesão do nervo alveolar inferior houve diminuição do limiar de alodinia, quando comparado à medida inicial, ao naïve e ao falso-operado com laserterapia (sham + laser) ambos utilizados como controle. Fenômeno semelhante já havia sido relatado, no qual a transecção do NAI produziu modificação sustentada no processamento sensorial, resultando em alodinia mecânica na área adjacente à área inervada pelo NAI lesionado (Tsuboi et al., 2004).

Também observamos que a laserterapia desempenhou um papel importante na reversão e no controle da sensibilidade dolorosa. O quadro nociceptivo foi revertido a partir da 2ª sessão de laser quando comparado com o grupo lesionado sem tratamento. Estes dados vêm de acordo com o que já observamos dentro da clínica odontológica e também com diversos estudos que avaliaram a aplicação da terapia com laser de baixa intensidade para controle da sintomatologia dolorosa (Alghadir et al., 2013; Gigo-Benato et al., 2005; Rochkind, 2009).

Neurotrofinas podem aumentar significativamente a recuperação morfológica e / ou funcional de nervos lesionados em ratos (Gravvanis et al., 2004). Nossos resultados de *immunoblotting* para a neurotrofina NGF indicaram que a laserterapia modulou expressão de NGF no nervo alveolar inferior, aumentando a sua expressão no grupo tratado com o laser.

Estudos relatam que a administração de NGF exógeno na porção terminal de nervos pode proteger os neurônios ganglionares da medula espinal após a lesão do nervo periférico, e por outro lado, o NGF pode promover a extensão axonal e mielinização (Zochodne D.W., 2002). No entanto, o NGF exógeno tem um tempo de meia vida curto no corpo (2.4 min) e sua atividade é reduzida por ação de fatores locais como temperatura e pH, sendo que nos últimos anos tem-se buscado técnicas para alcançar o efeito máximo da administração de NGF exógeno (Jubran; Widenfalk, 2003; Song et al., 2005). Outro estudo mostrou que o NGF simplesmente administrado em solução é difícil de ser retido no local da lesão, devido à sua difusão rápida em fluidos extracelulares (Sun et al., 2009). A fim de manter a concentração de NGF, são necessárias múltiplas injeções. No entanto, eles aumentam os custos e os riscos cirúrgicos. Além disso, o excesso de NGF nos locais de injeção e a difusão do NGF pode causar efeitos adversos, como sensibilização de nociceptores e dor (Sun et al., 2009). Dentro deste contexto, o aumento da expressão de NGF endógeno por meio da estimulação por raio laser aqui observado sugere que o laser pode vir a ser usado como uma ferramenta terapêutica auxiliar no processo de reparação de nervos periféricos lesionados, atuando como um acelerador do processo, uma vez que o aumento da expressão no NGF visto em nosso estudo não acarretou em alteração no teste comportamental.

Recentemente, tem havido fortes evidências de que neurotrofinas, em especial o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), desempenham um papel fundamental como mediador / modulador da dor (Matayoshi et al., 2005; Pezet; McMahon, 2006).

Estudos mostram que após a lesão do nervo, o aumento da produção BDNF em neurônios de grande diâmetro é transportado para os terminais centrais dos aferentes primários no corno dorsal da medula espinal, e ainda, que o BDNF pode modificar a excitabilidade dos seus neurônios alvo e contribuir para sensações neuropáticas (Miletic et al., 2004). Sendo que comportamentos relacionados com a dor, tais como alodinia, são atenuados pelo bloqueio de BDNF (Coull et al., 2005; Matayoshi et al., 2005; Zhou et al., 2000). Muitos estudos têm relatado que a injeção intratecal de trkB-IgG e anti-BDNF impede o desenvolvimento de hiperalgesia térmica e alodinia mecânica nos modelos de dor neuropática (Obata et al., 2006; Yajima et al., 2005). Assim, nossos resultados sobre a avaliação da neurotrofina BDNF no nervo alveolar inferior após a indução da lesão e o tratamento com laserterapia, indicam que a estimulação com raio laser agiu de forma positiva no controle da sensibilidade dolorosa, o que provavelmente ocorreu por meio da modulação negativa da expressão de BDNF.

Além da interferência do laser de baixa intensidade nos processos acima mencionados, observamos também que a aplicação do laser sobre o nervo alveolar inferior foi capaz de alterar a expressão de receptores para glutamato no gânglio trigeminal. Os receptores para glutamato do tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA) medeiam a neurotransmissão rápida no sistema nervoso central e são montados a partir de quatro subunidades GluR1-4 (ou GluR-A-D) (Seeburg et al., 2001).

É bem aceito que as lesões nervosas induzem a reorganização das projeções corticais e subcorticais do SNC (Chen et al., 2002; Navarro et al., 2007). Estudos tem reportado que neurônios do gânglio trigeminal (GT) têm interações funcionais uns com os outros, e interações neuronais entre os neurônios do GT são conhecidas por estar envolvidas no aumento da resposta nociva em neurônios aferentes primários inervando tecidos orofaciais não inflamados após inflamação ou lesão de tecidos adjacentes (Takeda et al., 2005b; Takeda et al., 2005a). Um estudo encontrou um aumento da excitabilidade de fibras do tipo A de neurônios do GT, mas não de fibras C, inervados pelo nervo orbital inferior após a transecção do NAI, resultando no desenvolvimento de alodinia mecânica na zona adjacente à lesão do nervo (Tsuboi et al., 2004). Estas alterações podem ser atribuídas à própria lesão e / ou ao ambiente alterado encontrado por axônios em regeneração no local da lesão e / ou tecido alvo, e conduzir a uma condição neuropática caracterizada por alodinia ou hiperalgesia (Campana et al., 2006; Iwata et al., 2001; Kitagawa et al., 2006). O GT desempenha um papel importante na transmissão da dor orofacial. No sistema somatossensorial trigeminal, os tecidos periodontais da maxila e da mandíbula são inervados principalmente por neurônios sensoriais primários do GT (Sessle, 2000). Em resposta à estimulação nociceptiva oral, os sinais são transmitidos para os neurônios do GT a partir dos tecidos periféricos (Canossa et al., 2002).

Os receptores do tipo AMPA regulam a maioria das transmissões sinápticas excitatórias no sistema nervoso central de mamíferos (Lee et al., 2003). Foi mostrado que a perda de receptores AMPA da célula pós-sináptica resulta numa diminuição da estabilidade de ramificação dendrítica (Haas et al., 2006), enquanto que a superexpressão de subunidades de receptores de AMPA tem sido associado com o aumento do número de segmentos da ramificação (Inglis et al., 2002; Prithviraj et al., 2008). Uma vez que a morfologia e a complexidade de dendritos neuronais influenciam a inervação aferente e os padrões de disparo de um neurônio (Schaefer et al., 2003; Vetter et al., 2001). Um estudo mostrou que nos neurônios motores da medula espinal, a superexpressão de GluR1 aumentou a complexidade dendrítica através da adição de ramificações (Inglis et al., 2002) e aumentou o

número de espinhos dendríticos e de sinapses excitatórias (Prithviraj et al., 2008), enquanto que a expressão de GluR2 foi associada com alongamento das ramificações atuais, e a redução na quantidade de novos espinhos dendríticos (Passafaro et al., 2003).

Em relação ao envolvimento dos receptores do tipo AMPA no processo de nocicepção e de sinalização, é bem documentado que a dor persistente leva a um aumento dos níveis de expressão de GluR1 sem mudanças significativas no nível GluR2 (Cull-Candy et al., 2006; Liu; Zukin, 2007), em nosso estudo, no entanto, vimos que a lesão do NAI não alterou a expressão proteica destas subunidades em nenhum dos tempos avaliados (mesmo no grupo que apresentava comportamento relacionado a dor). Enquanto que o tratamento com laser aumentou a expressão dos receptores GluR1 e GluR2, em especial na última sessão avaliada (com os animais sem apresentar comportamento nociceptivo). Um estudo focado em examinar os efeitos seletivos da deleção de GluR1 ou GluR2 em um modelo de dor crônica, mostrou que a deleção de GluR1 resultou em um maior limiar de dor e a eliminação de GluR2 teve o efeito oposto (Hartmann et al., 2004). Curiosamente, um experimento para avaliar o limiar da dor aguda, nem a deleção seletiva da subunidade GluR1 nem de GluR2 teve efeito para a transmissão de sinais de dor aguda (Kuner et al., 2005).

Acreditamos que o padrão de expressão dos receptores para glutamato (GluR1 e GluR2) encontradas em nossos resultados podem ser avaliados dentro deste contexto de reorganização do sistema trigeminal, o qual foi alterado pela condição patológica da neuralgia trigeminal, e após o tratamento com laserterapia houve um aumento da expressão destes receptores quando comparado aos animais do grupo controle e experimental. Não estando diretamente relacionado ao processo nociceptivo. Ainda a distribuição ubíqua do glutamato torna difícil formular estratégias que tenha como alvo a transmissão glutamatérgica envolvida em uma função específica, como a nocicepção, enquanto outros processos ocorrem paralelamente (Kung et al., 2013). Poucos estudos tratam da transmissão glutamatérgica intraganglionar, sendo necessárias outras abordagens experimentais para esclarecer este ponto. Somado a isto, devemos mencionar que a nocicepção é um processo complexo que envolve a interação de um conjunto de neurotransmissores e receptores bioquímicos em ambos os sistemas nervosos, periférico e central. Ainda, nociceptores podem responder a um único ou a combinações de estímulos nocivos e sua sensibilidade pode ser aumentada por substâncias endógenas (Coutaux et al., 2005; Woolf; Ma, 2007).

Outra questão avaliada neste projeto foi como a lesão do NAI alteraria a expressão de substâncias algogênicas e receptores sabidamente envolvidos na instalação do quadro hipernociceptivo e como eles contribuiriam para a manutenção deste estado. A literatura

mostra que a lesão de um nervo periférico é normalmente acompanhada não somente da alteração da função, mas também de dor persistente (Marcol et al., 2007). O receptor TRPV1 foi citado em muitos estudos, que abordavam os mecanismos de nocicepção, por desempenhar um papel essencial no desenvolvimento da dor neuropática induzida por lesão. Tem sido demonstrado que o bloqueio do receptor TRPV1 resultou em redução da dor em um modelo de ligação do nervo espinal em ratos (Christoph et al., 2007). O envolvimento do TRPV1 na geração de dor inflamatória já foi bem detalhado em estudos utilizando animais knock-out (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000) e também com o uso de diferentes antagonistas para TRPV1 (Garcia-Martinez et al., 2002; Walker et al., 2003). No entanto o papel do TRPV1 em situações de dor crônica é bem menos documentado. Principalmente pelo fato de que estudos abordando a lesão de nervos periféricos apresentaram uma regulação distinta da expressão de TRPV1 (Fukuoka et al., 2002; Hudson et al., 2001; Kanai et al., 2005). Em nossos resultados observamos que a lesão do NAI levou ao aumento da expressão de TRPV1 sendo que esta regulação foi concomitante com a redução do limiar nociceptivo dos animais submetidos à lesão do NAI. Somado aos dados de que após o tratamento com laser houve a reversão do comportamento hipernociceptivo e a redução da expressão proteica de TRPV1 podemos inferir que o TRPV1 pode estar relacionado com a instalação do quadro hipernociceptivo em nosso modelo. Destacando-se que a dor neuropática pós-lesão de nervos periféricos está associada a diferentes tipos de mecanismos para sua geração e manutenção. Também avaliamos a participação da SP e da CGRP em nosso modelo. A SP pode levar à sensibilização do receptor TRPV1 e consequente geração de estados hiperalgésicos por meio da interação do TRPV1 com receptores NK-1 para a substância P (Lin et al., 2007). Sendo que, estudos de imuno-histoquímica já demonstram que a SP e receptor NK1 são colocalizados com o canal TRPV1 em neurônios do gânglio da raiz dorsal ou do trigêmeo (Bae YC et al., 2004; Zhang et al., 2007). SP é um mediador importante envolvido na sensibilização do nociceptor, na hiperalgesia e na alodinia após lesão tecidual (Suzuki et al., 2002), e foi demonstrado que a aplicação de CGRP, produz uma excitação lenta e prolongada de neurônios no corno dorsal (Hansen; Ashina, 2014; Yoshimura; Yonehara, 2006). Além disso, CGRP pode facilitar a nocicepção, atrasando o metabolismo de SP e também aumentando a liberação de glutamato e SP nas terminações centrais de fibras aferentes primárias (Sun et al., 2004).

No presente estudo a lesão IAN levou a um aumento da expressão proteica de SP e similarmente aos resultados para TRPV1, nossos resultados também mostraram que a terapia com laser reduziu a expressão de SP no GT. Por outro lado, a lesão do NAI não alterou a

expressão de CGRP, enquanto, o tratamento com laser levou a uma redução da expressão de CGRP. Baseando-se nestas observações, a hipótese que podemos sugerir é que o possível mecanismo da alodinia mecânica após a lesão do NAI não está relacionada diretamente a regulação dos receptores do tipo AMPAR e da expressão CGRP no GT; esse comportamento pode ser devido à expressão SP e TRPV1 que leva a sensibilização dos aferentes trigeminais.

Após a lesão do nervo existem várias respostas por parte do axônio, de células de apoio e do microambiente, antes da regeneração poder começar; gradientes tanto inibitórios quanto estimulatórios existem para fornecer sinais de orientação necessários para guiar o crescimento (Goldberg, 2000; Kapur; Shoichet, 2003). Após a lesão, no coto distal ocorre um processo denominado degeneração Walleriana, que é a fragmentação da bainha de mielina e dos axônios lesados. Juntamente com este processo ocorre a migração de macrófagos e a multiplicação de Células de Schwann (CS), que atuam na fagocitose da bainha de mielina e de neurofilamentos dos axônios em degeneração (Cheng; Zochodne, 2002; Schmidt; Leach, 2003; Stoll et al., 2002) estes eventos criam assim um microambiente favorável ao crescimento e orientação axonal em direção ao órgão alvo, fator determinante para o sucesso do processo regenerativo (Zochodne, 2000).

Subsequentemente a uma lesão nervosa, a lâmina basal não sofre degradação, permanece como tubos vazios servindo como substrato para o crescimento, a maturação e para a orientação dos axônios em regeneração. Somente algumas moléculas da matriz extracelular (ECM), como a laminina, por exemplo, têm seus níveis alterados após lesão periférica (Matesz et al., 2005). Enquanto interações com moléculas da matriz extracelular (ECM) podem influenciar mudanças morfológicas, migração e diferenciação. Um dos principais componentes da MEC a laminina (Thyboll et al., 2002) é necessária para a mielinização in vivo (Yang et al., 2005) e in vitro (Fragoso et al., 2003). Para demonstrar a importância das lamininas Thompson & Buettner demonstraram que as SC juntamente com os axônios orientam-se e crescem em um substrato rico em laminina (Thompson; Buettner, 2001).

A laminina é conhecida como um fator importante de promoção do crescimento de neurites e também por facilitar a formação do cone de crescimento. Após lesões de nervos periféricos, a laminina é significativamente aumentada nos locais de lesão (Thompson; Buettner, 2001). A laminina é produzida principalmente por células de Schwann e amplamente dispersa no sistema nervoso periférico. A laminina é uma proteína de adesão da ECM, que parece ser uma importante molécula de orientação para o desenvolvimento de axônios in vivo (Chen; Strickland, 2003).

Em nossos experimentos também observamos esse padrão de expressão, no qual observamos que após a lesão houve um aumento da expressão de laminina nos animais lesionados em relação aos grupos controles. Após o tratamento com laser vimos uma diminuição do padrão de expressão da laminina, tanto em relação ao grupo operado quanto aos grupos controles, acreditamos que esta regulação da expressão da laminina por meio do laser ocorreu pelo fato de o laser ter acelerado o processo de reparação do nervo alveolar inferior. Um estudo usando o modelo de lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos mostrou que a administração de laminina coaptada com NGF promoveu a reparação dos nervos periféricos e foi capaz de melhorar a restauração funcional após danos nervosos (Sun et al., 2009). Outro estudo mostrou que o sucesso das células de Schwann na regeneração do nervo periférico resulta em parte da produção de moléculas de adesão celular e fatores neurotróficos que medeiam a adesão e crescimento de neurites, particularmente laminina 1 (LN-1) e NGF (Bajrovic et al., 2001; Yu; Bellamkonda, 2003).

A ligação da laminina com as integrinas torna as integrinas ativas por meio de uma alteração conformacional que, em seguida, promove o crescimento de neurites. No entanto, a laminina mediando o crescimento de neurites requer a participação de NGF (Ivins et al., 2000; Tucker et al., 2005).

Tanto o meio extracelular por meio do qual os axônios crescem, bem como a disponibilidade e ação de fatores neurotróficos desempenham papéis fundamentais na regulação do crescimento e regeneração axonal. Sendo que foi mostrado que parece haver uma convergência das vias de sinalização de NGF e integrinas ativadas, e isto pode estar subjacente aos efeitos de reforço observados da laminina ou outras moléculas de ECM sobre respostas celulares dependentes de fatores de crescimento (Tucker et al., 2005). Outro estudo mostrou que a laminina é um substrato de plasmina que é clivada durante o crescimento de neurites induzido por NGF (Gutierrez-Fernandez et al., 2007). Além disso, também sugerem que esta degradação é um importante mecanismo para facilitar o crescimento de neurites (Gutierrez-Fernandez et al., 2009).

Buscando mais evidências de que a aplicação do laser de baixa intensidade no nervo lesionado pode interferir no processo de regeneração do nervo, também avaliamos a Proteína mielínica zero (P0), um marcador de mielinização, que é a proteína mais abundante no interior da bainha de mielina periférica (Rotenstein et al., 2008). P0 medeia interações célula-a-célula através de ligação homofílica e estabiliza a linha densa principal no sistema nervoso periférico, o que é essencial para a formação de mielina e à sua manutenção e identificada nas secções transversais da bainha de mielina (Shen et al., 2011).

Os principais acontecimentos na regeneração nervosa periférica são extensão axonal e mielinização, no qual as células de Schwann envolvem os axônios para produzir a bainha de mielina (Dombrowski et al., 2006; Garbay et al., 2000). A expressão da P0 é específica para a bainha de mielina no sistema nervoso periférico e é usado como indicador para o processo de mielinização (Wang et al., 2011). Percebemos para a P0 o mesmo padrão de expressão visto para a laminina, um aumento em sua expressão nos animais com lesão e uma diminuição após o tratamento com laser. O que nos levou a hipótese de que o laser estava acelerando a inclusão destas proteínas no tecido lesionado o que por consequência poderia ser visto como indício do aumento da taxa de reparo do nervo.

Vários estudos sugerem que o calibre dos axônios mielinizados é primariamente dependente do número de neurofilamentos, e evidências mais recentes sugerem que neurofilamentos desempenham um papel ativo na excrescência axonal (Yin et al., 2001).

Durante a regeneração do nervo, a expressão de neurofilamentos indica a evidência inicial do potencial de regeneração nervosa (Varejao et al., 2004). Assim, no presente estudo, utilizamos também um coquetel de anticorpos monoclonais que reagem com as proteínas do neurofilamento de 68 kDa, 160 kDa e 200 kDa (marcador neuronal pan; 1: 200; Millipore; Temecula, CA, EUA) para avaliar a intensidade da regeneração do nervo após terapia laser.

Em nossos resultados podemos observar alterações na expressão de neurofilamentos, em especial do NF-H, no NAI no grupo de animais operados (Op) quando comparado com o grupo controle (naive). Após as 10 sessões de laserterapia no grupo Op + laser foi observado uma diminuição na expressão de todos os neurofilamentos quando comparado com o grupo naive. A principal função reconhecida para os NFs é aumentar o calibre axonal de axônios mielinizados e, conseqüentemente, a sua velocidade de condução. Eles também contribuem para as propriedades dinâmicas do citoesqueleto axonal durante a diferenciação neuronal, crescimento axonal, regeneração e orientação (Perrot et al., 2008). No presente estudo, aliado a análise dos marcadores para o processo de mielinização acima citados, também realizamos a morfometria quantitativa das imagens de microscopia eletrônica na qual foi avaliada: diâmetro da fibra nervosa, diâmetro do axônio e a espessura da bainha de mielina. Estes parâmetros são considerados os mais relevantes da avaliação da recuperação do nervo (Bascom et al., 2000).

Ao comparar as microfotografias entre os grupos avaliados (controle, Op e Op+laser) percebemos diferenças visualmente importantes: para o grupo controle observamos os axônios relativamente arredondados, com diâmetros aparentemente regulares, distribuídos homogeneamente e com bainha de mielina densa e espessa. O grupo Op mostrou uma clara

alteração na morfologia dos axônios, como diminuição do tamanho axonal e formação irregular da bainha de mielina. O grupo Op+laser apresentou axônios regulares, de diâmetros similares e distribuídos homogeneamente aproximando-se do que foi visto no nervo normal. Quando comparamos os resultados obtidos para os parâmetros avaliados, constatamos que também houve diferenças para o diâmetro da fibra nervosa (6,68 - 3,21 - 4,80), para o diâmetro do axônio (4,25 - 2,12 - 2,78) e para a espessura da bainha de mielina (1,02 - 0,34 - 0,49) nos grupos controle, Op e Op+laser respectivamente. A junção da avaliação qualitativa (visual/subjetiva) com a avaliação quantitativa (dados morfométricos) auxilia na avaliação da qualidade da regeneração neural (Costa et al., 2006).

A otimização da regeneração neural e, por consequência, a mielinização são cruciais para função neurológica adequada, o que gera um interesse significativo para compreender os eventos moleculares que regulam a formação de mielina em desenvolvimento e após lesões, uma vez que isso pode permitir a concepção de tratamentos destinados a promover a remielinização e assim restaurar a função normal para pacientes que sofrem de doenças desmielinizantes (Bai et al., 2011). Pois, embora no último século, tenha havido um aumento no entendimento de reabilitação de nervos periféricos (Dvali; Mackinnon, 2003; Lundborg, 2000; Naff; Ecklund, 2001; Zeng et al., 2013), ainda há uma falta de métodos de tratamento totalmente eficazes, e um resultado totalmente funcional, é raramente alcançado, levando a uma perda parcial ou total de funções motoras, sensoriais e autonômicas (Rui et al., 2013).

Recentemente têm surgido muitos estudos utilizando-se dos mais diferentes métodos para conectar nervos lesionados para acelerar e/ou melhorar o processo de reparação de nervos periféricos (Schmidt; Leach, 2003). Sendo que as abordagens não cirúrgicas tais como estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS) (Malm-Buatsi et al., 2007; Tong et al., 2007), estimulação da medula espinal (SCS) (Hamid; Hayek, 2008; Robaina; Clavo, 2007), estimulação cerebral profunda (DBS) (Blomstedt, 2002; Hamani et al., 2006), têm sido desenvolvidos para melhorar a recuperação do nervo, e, em nosso estudo excelentes resultados foram obtidos no grupo tratado com laser de baixa intensidade. Como técnicas cirúrgicas de reparo do nervo não podem ser mais refinadas e por nem sempre o nervo lesado ter um fácil acesso cirúrgico existe uma necessidade de estratégias novas e melhoradas para aumentar a regeneração após lesões nervosas (Lundborg, 2003). Os resultados apresentados neste trabalho confirmam o sucesso do estabelecimento do modelo de lesão por esmagamento do nervo alveolar inferior, além de revelar que o padrão de estimulação selecionado (comprimento de onda de 904 nm e densidade de energia de 6 J/cm²) é eficaz.

Assim, baseado na expressão dos marcadores para regeneração do nervo, podemos observar um proeminente papel regenerativo da aplicação do laser de baixa intensidade no grupo tratado. O que confirma o papel da laserterapia como uma ferramenta terapêutica. Apesar de a LLLT ter modificado os requisitos específicos do microambiente da lesão responsáveis pela regeneração de neurônios, já descritos na literatura (Grimpe; Silver, 2002; Tucker et al., 2005) estudos futuros são necessários para caracterizar ainda mais os pontos de colaboração entre estes fatores e LLLT para a otimização da regeneração. Sendo que estes resultados fornecem uma abordagem para futuros estudos em que seria possível utilizar a laserterapia para avaliar outros mecanismos de dor neuropática trigeminal e regeneração neural.

6 CONCLUSÃO

Em síntese o tratamento com a técnica de laserterapia foi capaz de reverter, a partir da segunda sessão, a nocicepção induzida pela lesão no NAI. O protocolo proposto foi capaz de promover a regeneração do NAI lesionado, que ficou evidenciado por meio da modulação da expressão de proteínas relacionadas ao processo de reparação do tecido nervoso e confirmada pela análise da morfologia do nervo por microscopia eletrônica. A modulação dos receptores para glutamato (GluR1 e GluR2) no gânglio trigeminal não parecem estar envolvidos no processo da neuropatia trigeminal pós lesão, porém após o tratamento com laserterapia, a modulação de sua expressão provavelmente está envolvida no processo de reorganização do sistema trigeminal após a reversão do quadro hipernociceptivo. Ainda, vimos que o processo de nocicepção em nosso modelo envolveu a participação do TRPV1, da SP e da CGRP.

Dor neuropática orofacial devido à lesão de nervo do sistema trigeminal pode ser uma das condições mais severas e debilitantes da dor neuropática, com opções terapêuticas limitadas. Com este trabalho apresentamos um protocolo que demonstrou ser eficiente para esta situação e certamente poderá auxiliar na prática clínica durante o tratamento de lesões do NAI sejam elas de causas idiopáticas, iatrogênicas ou devido a traumas da região mandibular.

REFERÊNCIAS*

- Albrektsson T, Hansson HA. An ultrastructural characterization of the interface between bone and sputtered titanium or stainless steel surfaces. *Biomaterials*. 1986; 7(3): 201-5.
- Alghadir A, Omar MT, Al-Askar AB, Al-Muteri NK. Effect of low-level laser therapy in patients with chronic knee osteoarthritis: a single-blinded randomized clinical study. *Lasers Med Sci*. 2013.
- Allodi I, Udina E, Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog Neurobiol*. 2012; 98(1): 16-37.
- Almeida RD, Manadas BJ, Melo CV, Gomes JR, Mendes CS, Graos MM, Carvalho RF, Carvalho AP, Duarte CB. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death Differ*. 2005; 12(10): 1329-43.
- Amaya F, Oh-hashii K, Naruse Y, Iijima N, Ueda M, Shimosato G, Tominaga M, Tanaka Y, Tanaka M. Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons. *Brain Res*. 2003; 963(1-2): 190-6.
- Amorim JC, de Sousa GR, de Barros Silveira L, Prates RA, Pinotti M, Ribeiro MS. Clinical study of the gingiva healing after gingivectomy and low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*. 2006; 24(5): 588-94.
- Andraus R BC, Mazzer N. . A irradiação local com o laser de baixa potência acelera a regeneração do nervo fibular de ratos. *Acta Ortop Bras*. 2010; 18(3): 152-7.
- Armstrong N, Gouaux E. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron*. 2000; 28(1): 165-81.
- Asai H, Ozaki N, Shinoda M, Nagamine K, Tohnai I, Ueda M, Sugiura Y. Heat and mechanical hyperalgesia in mice model of cancer pain. *Pain*. 2005; 117(1-2): 19-29.
- Attal N, Cruccu G, Baron R, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur J Neurol*. 2010; 17(9): 1113-e88.
- Awawdeh L, Lundy FT, Shaw C, Lamey PJ, Linden GJ, Kennedy JG. Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in pulp tissue from painful and healthy human teeth. *Int Endod J*. 2002; 35(1): 30-6.
- Backonja MM. Defining neuropathic pain. *Anesth Analg*. 2003; 97(3): 785-90.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- Bae CS, Lim SC, Kim KY, Song CH, Pak S, Kim SG, Jang CH. Effect of Ga-as laser on the regeneration of injured sciatic nerves in the rat. *In Vivo*. 2004; 18(4): 489-95.
- Bae YC, Oh JM, Hwang SJ, Shigenaga Y, Valtschanoff JG. Expression of vanilloid receptor TRPV1 in the rat trigeminal sensory nuclei. *J Comp Neurol*. 2004; 478(1): 62-71.
- Bai Q, Sun M, Stolz DB, Burton EA. Major isoform of zebrafish P0 is a 23.5 kDa myelin glycoprotein expressed in selected white matter tracts of the central nervous system. *J Comp Neurol*. 2011; 519(8): 1580-96.
- Bajrovic F, Srpacic M, Sketelj J. Schwann cell dependence of regenerating rat sensory neurons is inversely related to the quality of axon growth substratum. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001; 60(1): 65-74.
- Barbosa RI, Marcolino AM, de Jesus Guirro RR, Mazzer N, Barbieri CH, de Cassia Registro Fonseca M. Comparative effects of wavelengths of low-power laser in regeneration of sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci*. 2010; 25(3): 423-30.
- Bascom DA, Schaitkin BM, May M, Klein S. Facial nerve repair: a retrospective review. *Facial Plast Surg*. 2000; 16(4): 309-13.
- Battiston B, Tos P, Conforti LG, Geuna S. Alternative techniques for peripheral nerve repair: conduits and end-to-side neurorrhaphy. *Acta Neurochir Suppl*. 2007; 100: 43-50.
- Baxter GD, Diamantopoulos C. *Therapeutic Lasers: Theory and Practice* Churchill Livingstone; 1994. p. 259.
- Beirowski B, Adalbert R, Wagner D, Grumme DS, Addicks K, Ribchester RR, Coleman MP. The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (WldS) nerves. *BMC Neurosci*. 2005; 6: 6.
- Bennet MIS, B. H.; Torrance, N.; Lee, A. J. . Can pain can be more or less neuropathic? Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians. *Pain*. 2006; v. 122: p. 289-94.
- Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988; 33(1): 87-107.
- Benoliel R, Eliav E, Iadarola MJ. Neuropeptide Y in trigeminal ganglion following chronic constriction injury of the rat infraorbital nerve: is there correlation to somatosensory parameters? *Pain*. 2001a; 91(1-2): 111-21.
- Benoliel R, Eliav E, Tal M. No sympathetic nerve sprouting in rat trigeminal ganglion following painful and non-painful infraorbital nerve neuropathy. *Neurosci Lett*. 2001b; 297(3): 151-4.
- Bereiter DA HK, Hu JW. Trigeminal mechanisms of nociception: peripheral and brainstem organization. In: Allan I. Basbaum AK, Gordon M. Shepherd, Gerald Westheimer, Thomas D. Albright, Richard H. Masland, Peter Dallos, Donata Oertel, Stuart Firestein, Gary K.

- Beauchamp, M. Catherine Bushnell, Jon H. Kaas, Esther Gardner editor. *The Senses: A Comprehensive Reference*. New York City: Elsevier Inc.; 2010. p. pp. 435–60.
- Bird GC, Han JS, Fu Y, Adwanikar H, Willis WD, Neugebauer V. Pain-related synaptic plasticity in spinal dorsal horn neurons: role of CGRP. *Mol Pain*. 2006; 2: 31.
- Bleakman D, Alt A, Nisenbaum ES. Glutamate receptors and pain. *Semin Cell Dev Biol*. 2006; 17(5): 592-604.
- Blomstedt P. Deep-brain stimulation in Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2002; 346(6): 452-3.
- Bowles WR, Withrow JC, Lepinski AM, Hargreaves KM. Tissue levels of immunoreactive substance P are increased in patients with irreversible pulpitis. *J Endod*. 2003; 29(4): 265-7.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.
- Breese NM, George AC, Pauers LE, Stucky CL. Peripheral inflammation selectively increases TRPV1 function in IB4-positive sensory neurons from adult mouse. *Pain*. 2005; 115(1-2): 37-49.
- Brennan TJZ, P. K.; Pogatzki-Zahn, E. M. Mechanisms of incisional pain. *Anesthesiol Clin North America*. 2005; 23(1): 1-20.
- Brown AM, Tekkok SB, Ransom BR. Glycogen regulation and functional role in mouse white matter. *J Physiol*. 2003; 549(Pt 2): 501-12.
- Brushart TM. *Nerve Repair* Oxford University Press; 2011. p. 480.
- Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*. 2004; 16(5): E1.
- Campana WM, Li X, Dragojlovic N, Janes J, Gaultier A, Gonias SL. The low-density lipoprotein receptor-related protein is a pro-survival receptor in Schwann cells: possible implications in peripheral nerve injury. *J Neurosci*. 2006; 26(43): 11197-207.
- Canossa M, Giordano E, Cappello S, Guarnieri C, Ferri S. Nitric oxide down-regulates brain-derived neurotrophic factor secretion in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(5): 3282-7.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeititz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*. 2000; 288(5464): 306-13.
- Caviedes-Bucheli J, Lombana N, Azuero-Holguin MM, Munoz HR. Quantification of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide, substance P, neurokinin A, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide) expressed in healthy and inflamed human dental pulp. *Int Endod J*. 2006; 39(5): 394-400.

- Chan WK, Yabe JT, Pimenta AF, Ortiz D, Shea TB. Growth cones contain a dynamic population of neurofilament subunits. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2003; 54(3): 195-207.
- Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*. 2003; 4(4): 299-309.
- Chaplan SR, Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M. & Yaksh, T.L. . Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods*. 1994; 53: 55-63.
- Chen AC, Arany PR, Huang YY, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB, Saleem T, Mooney D, Yull FE, Blackwell TS, Hamblin MR. Low-level laser therapy activates NF- κ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One*. 2011; 6(7): e22453.
- Chen R, Cohen LG, Hallett M. Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience*. 2002; 111(4): 761-73.
- Chen ZL, Strickland S. Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J Cell Biol*. 2003; 163(4): 889-99.
- Cheng C, Zochodne DW. In vivo proliferation, migration and phenotypic changes of Schwann cells in the presence of myelinated fibers. *Neuroscience*. 2002; 115(1): 321-9.
- Chidiac JJ, Rifai K, Hawwa NN, Massaad CA, Jurjus AR, Jabbur SJ, Saade NE. Nociceptive behaviour induced by dental application of irritants to rat incisors: a new model for tooth inflammatory pain. *Eur J Pain*. 2002; 6(1): 55-67.
- Christensen D, Gautron M, Guilbaud G, Kayser V. Combined systemic administration of the glycine/NMDA receptor antagonist, (+)-HA966 and morphine attenuates pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Pain*. 1999; 83(3): 433-40.
- Christoph T, Gillen C, Mika J, Grunweller A, Schafer MK, Schiene K, Frank R, Jostock R, Bahrenberg G, Weihe E, Erdmann VA, Kurreck J. Antinociceptive effect of antisense oligonucleotides against the vanilloid receptor VR1/TRPV1. *Neurochem Int*. 2007; 50(1): 281-90.
- Ciena AP, de Almeida SR, Dias FJ, Bolina Cde S, Issa JP, Iyomasa MM, Ogawa K, Watanabe IS. Fine structure of myotendinous junction between the anterior belly of the digastric muscle and intermediate tendon in adults rats. *Micron*. 2012; 43(2-3): 258-62.
- Coderre TJ. Spinal cord mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *The Senses: A Comprehensive Reference*. 2006; vol. 5: 339–80.
- Costa HJZR, Silva CFd, Korn GP, Lazarini PR. Regeneração pós-traumática do nervo facial em coelhos. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2006; 72: 786-93.
- Cotman CW, Monaghan DT, Ganong AH. Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 1988; 11: 61-80.

- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*. 2005; 438(7070): 1017-21.
- Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine*. 2005; 72(5): 359-71.
- Cruccu G, Biasiotta A, Di Rezze S, Fiorelli M, Galeotti F, Innocenti P, Mameli S, Millefiorini E, Truini A. Trigeminal neuralgia and pain related to multiple sclerosis. *Pain*. 2009; 143(3): 186-91.
- Cull-Candy S, Kelly L, Farrant M. Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Curr Opin Neurobiol*. 2006; 16(3): 288-97.
- Davies AJK, Y. H.; OH, S. B. . Painful Neuron-Microglia Interactions in the Trigeminal Sensory System. . *The Open Pain Journal*. 2010; v. 3, : p. 14-28.
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*. 2000; 405(6783): 183-7.
- Dawbarn D, Allen SJ. Neurotrophins and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2003; 29(3): 211-30.
- DeLeo JA, Yezierski RP. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain*. 2001; 90(1-2): 1-6.
- Denadai-Souza A, Camargo Lde L, Ribela MT, Keeble JE, Costa SK, Muscara MN. Participation of peripheral tachykinin NK1 receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. *Eur J Pain*. 2009; 13(8): 812-9.
- Devor M, Govrin-Lippmann R. Selective regeneration of sensory fibers following nerve crush injury. *Exp Neurol*. 1979; 65(2): 243-54.
- Dombrowski MA, Sasaki M, Lankford KL, Kocsis JD, Radtke C. Myelination and nodal formation of regenerated peripheral nerve fibers following transplantation of acutely prepared olfactory ensheathing cells. *Brain Res*. 2006; 1125(1): 1-8.
- Dvali L, Mackinnon S. Nerve repair, grafting, and nerve transfers. *Clin Plast Surg*. 2003; 30(2): 203-21.
- Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ, Bushnell MC, Farrar JT, Galer BS, Haythornthwaite JA, Hewitt DJ, Loeser JD, Max MB, Saltarelli M, Schmader KE, Stein C, Thompson D, Turk DC, Wallace MS, Watkins LR, Weinstein SM. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol*. 2003; 60(11): 1524-34.
- Edlund T, Jessell TM. Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell*. 1999; 96(2): 211-24.

- Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacol Ther.* 2008; 120(1): 1-34.
- Epelbaum E. Tratamento de Deficiência Neurosensorial por Laser em Baixa Intensidade e sua Associação a Acunputura a Laser São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.
- Fan W, Huang F, Wu Z, Zhu X, Li D, He H. The role of nitric oxide in orofacial pain. *Nitric Oxide.* 2012; 26(1): 32-7.
- Fehrenbach MJ, Herring SW. *Illustrated Anatomy of the Head and Neck.* St. Louis: Elsevier Health Sciences; 2013. p. 336.
- Ferreira DM, Zangaro RA, Villaverde AB, Cury Y, Frigo L, Picolo G, Longo I, Barbosa DG. Analgesic effect of He-Ne (632.8 nm) low-level laser therapy on acute inflammatory pain. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23(2): 177-81.
- Finnerup NB, Sindrup SH, Jensen TS. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain.* 2010; 150(3): 573-81.
- Fragoso G, Robertson J, Athlan E, Tam E, Almazan G, Mushynski WE. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase interferes with cell shape changes and gene expression associated with Schwann cell myelination. *Exp Neurol.* 2003; 183(1): 34-46.
- Fried K, Bongenhielm U, Boissonade FM, Robinson PP. Nerve injury-induced pain in the trigeminal system. *Neuroscientist.* 2001; 7(2): 155-65.
- Fukuoka T, Tokunaga A, Tachibana T, Dai Y, Yamanaka H, Noguchi K. VR1, but not P2X(3), increases in the spared L4 DRG in rats with L5 spinal nerve ligation. *Pain.* 2002; 99(1-2): 111-20.
- Gal P, Mokry M, Vidinsky B, Kilik R, Depta F, Harakalova M, Longauer F, Mozes S, Sabo J. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and corticosteroid-treated rats. *Lasers Med Sci.* 2009; 24(4): 539-47.
- Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol.* 2000; 61(3): 267-304.
- Garcia-Martinez C, Humet M, Planells-Cases R, Gomis A, Caprini M, Viana F, De La Pena E, Sanchez-Baeza F, Carbonell T, De Felipe C, Perez-Paya E, Belmonte C, Messeguer A, Ferrer-Montiel A. Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(4): 2374-9.
- Geng SJ, Liao FF, Dang WH, Ding X, Liu XD, Cai J, Han JS, Wan Y, Xing GG. Contribution of the spinal cord BDNF to the development of neuropathic pain by activation of the NR2B-containing NMDA receptors in rats with spinal nerve ligation. *Exp Neurol.* 2010; 222(2): 256-66.

- Gigo-Benato D, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. *Muscle Nerve*. 2005; 31(6): 694-701.
- Goldberg JL, Barres, B.A. The relationship between neuronal survival and regeneration. *Annu Rev Neurosci* 2000; 23: 512-79.
- Gooch C, Podwall D. The diabetic neuropathies. *Neurologist*. 2004; 10(6): 311-22.
- Gravvanis AI, Tsoutsos DA, Tagaris GA, Papalois AE, Patralexis CG, Iconomou TG, Panayotou PN, Ioannovich JD. Beneficial effect of nerve growth factor-7S on peripheral nerve regeneration through inside-out vein grafts: an experimental study. *Microsurgery*. 2004; 24(5): 408-15.
- Grimpe B, Silver J. The extracellular matrix in axon regeneration. *Prog Brain Res*. 2002; 137: 333-49.
- Gutierrez-Fernandez A, Gingles NA, Bai H, Castellino FJ, Parmer RJ, Miles LA. Plasminogen enhances neuritogenesis on laminin-1. *J Neurosci*. 2009; 29(40): 12393-400.
- Gutierrez-Fernandez A, Parmer RJ, Miles LA. Plasminogen gene expression is regulated by nerve growth factor. *J Thromb Haemost*. 2007; 5(8): 1715-25.
- Ha SO, Kim JK, Hong HS, Kim DS, Cho HJ. Expression of brain-derived neurotrophic factor in rat dorsal root ganglia, spinal cord and gracile nuclei in experimental models of neuropathic pain. *Neuroscience*. 2001; 107(2): 301-9.
- Haas K, Li J, Cline HT. AMPA receptors regulate experience-dependent dendritic arbor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(32): 12127-31.
- Hamani C, Schwalb JM, Rezai AR, Dostrovsky JO, Davis KD, Lozano AM. Deep brain stimulation for chronic neuropathic pain: long-term outcome and the incidence of insertional effect. *Pain*. 2006; 125(1-2): 188-96.
- Hamid S, Hayek R. Role of electrical stimulation for rehabilitation and regeneration after spinal cord injury: an overview. *Eur Spine J*. 2008; 17(9): 1256-69.
- Hansen JM, Ashina M. Calcitonin gene-related peptide and migraine with aura: A systematic review. *Cephalalgia*. 2014; 34(9): 695-707.
- Hartmann B, Ahmadi S, Heppenstall PA, Lewin GR, Schott C, Borchardt T, Seeburg PH, Zeilhofer HU, Sprengel R, Kuner R. The AMPA receptor subunits GluR-A and GluR-B reciprocally modulate spinal synaptic plasticity and inflammatory pain. *Neuron*. 2004; 44(4): 637-50.
- Hashmi JT, Huang YY, Sharma SK, Kurup DB, De Taboada L, Carroll JD, Hamblin MR. Effect of pulsing in low-level light therapy. *Lasers Surg Med*. 2010; 42(6): 450-66.
- Henry MA, Freking AR, Johnson LR, Levinson SR. Increased sodium channel immunofluorescence at myelinated and demyelinated sites following an inflammatory and partial axotomy lesion of the rat infraorbital nerve. *Pain*. 2006; 124(1-2): 222-33.

- Hu WP, Wang JJ, Yu CL, Lan CC, Chen GS, Yu HS. Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. *J Invest Dermatol.* 2007; 127(8): 2048-57.
- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24: 677-736.
- Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2003; 72: 609-42.
- Huber AB, Kolodkin AL, Ginty DD, Cloutier JF. Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu Rev Neurosci.* 2003; 26: 509-63.
- Hudson LJ, Bevan S, Wotherspoon G, Gentry C, Fox A, Winter J. VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *Eur J Neurosci.* 2001; 13(11): 2105-14.
- Inglis FM, Crockett R, Korada S, Abraham WC, Hollmann M, Kalb RG. The AMPA receptor subunit GluR1 regulates dendritic architecture of motor neurons. *J Neurosci.* 2002; 22(18): 8042-51.
- Ivins JK, Yurchenco PD, Lander AD. Regulation of neurite outgrowth by integrin activation. *J Neurosci.* 2000; 20(17): 6551-60.
- Iwata K, Imai T, Tsuboi Y, Tashiro A, Ogawa A, Morimoto T, Masuda Y, Tachibana Y, Hu J. Alteration of medullary dorsal horn neuronal activity following inferior alveolar nerve transection in rats. *J Neurophysiol.* 2001; 86(6): 2868-77.
- Iwata K, Imamura Y, Honda K, Shinoda M. Physiological mechanisms of neuropathic pain: the orofacial region. *Int Rev Neurobiol.* 2011; 97: 227-50.
- Iwata K, Tsuboi Y, Shima A, Harada T, Ren K, Kanda K, Kitagawa J. Central neuronal changes after nerve injury: neuroplastic influences of injury and aging. *J Orofac Pain.* 2004; 18(4): 293-8.
- Jenkins PAC, J.D. How to Report Low-Level Laser Therapy (LLLT)/ Photomedicine Dose and Beam Parameters in Clinical and Laboratory Studies. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2011; 29: 785-7.
- Jubran M, Widenfalk J. Repair of peripheral nerve transections with fibrin sealant containing neurotrophic factors. *Exp Neurol.* 2003; 181(2): 204-12.
- Julius DB, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 2001; 413(6852): 203-10.
- Kanai Y, Nakazato E, Fujiuchi A, Hara T, Imai A. Involvement of an increased spinal TRPV1 sensitization through its up-regulation in mechanical allodynia of CCI rats. *Neuropharmacology.* 2005; 49(7): 977-84.

- Kapur TA, Shoichet MS. Chemically-bound nerve growth factor for neural tissue engineering applications. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2003; 14(4): 383-94.
- Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B.* 1999; 49(1): 1-17.
- Khawaja N, Renton T. Case studies on implant removal influencing the resolution of inferior alveolar nerve injury. *Br Dent J.* 2009; 206(7): 365-70.
- Kim HY, Park CK, Cho IH, Jung SJ, Kim JS, Oh SB. Differential Changes in TRPV1 expression after trigeminal sensory nerve injury. *J Pain.* 2008; 9(3): 280-8.
- Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain.* 1992; 50(3): 355-63.
- Kingham PJ, Terenghi G. Bioengineered nerve regeneration and muscle reinnervation. *J Anat.* 2006; 209(4): 511-26.
- Kitagawa J, Takeda M, Suzuki I, Kadoi J, Tsuboi Y, Honda K, Matsumoto S, Nakagawa H, Tanabe A, Iwata K. Mechanisms involved in modulation of trigeminal primary afferent activity in rats with peripheral mononeuropathy. *Eur J Neurosci.* 2006; 24(7): 1976-86.
- Kitt CA, Gruber K, Davis M, Woolf CJ, Levine JD. Trigeminal neuralgia: opportunities for research and treatment. *Pain.* 2000; 85(1-2): 3-7.
- Krafft RM. Trigeminal neuralgia. *Am Fam Physician.* 2008; 77(9): 1291-6.
- Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, d'Hoedt B. Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002; 30(5): 365-9.
- Kuhlein HN, Tegeder I, Moser C, Lim HY, Haussler A, Spieth K, Jennes I, Marschalek R, Beckhaus T, Karas M, Fauth M, Ehnert C, Geisslinger G, Niederberger E. Nerve injury evoked loss of latexin expression in spinal cord neurons contributes to the development of neuropathic pain. *PLoS One.* 2011; 6(4): e19270.
- Kuner R, Groom AJ, Bresink I, Kornau HC, Stefovskaja V, Muller G, Hartmann B, Tschauner K, Waibel S, Ludolph AC, Ikonomidou C, Seeburg PH, Turski L. Late-onset motoneuron disease caused by a functionally modified AMPA receptor subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(16): 5826-31.
- Kung LH, Gong K, Adedoyin M, Ng J, Bhargava A, Ohara PT, Jasmin L. Evidence for glutamate as a neuroglial transmitter within sensory ganglia. *PLoS One.* 2013; 8(7): e68312.
- Lapchak PA, De Taboada L. Transcranial near infrared laser treatment (NILT) increases cortical adenosine-5'-triphosphate (ATP) content following embolic strokes in rabbits. *Brain Res.* 2010; 1306: 100-5.
- Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain.* 2009; 10(9): 895-926.

- Lavi R, Shainberg A, Friedmann H, Shneyvays V, Rickover O, Eichler M, Kaplan D, Lubart R. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *J Biol Chem*. 2003; 278(42): 40917-22.
- Lazarov NE. The mesencephalic trigeminal nucleus in the cat. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2000; 153: iii-xiv, 1-103.
- Lazarov NE. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog Neurobiol*. 2002; 66(1): 19-59.
- Lee AC, Yu VM, Lowe JB, 3rd, Brenner MJ, Hunter DA, Mackinnon SE, Sakiyama-Elbert SE. Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2003; 184(1): 295-303.
- Lee J, Duan W, Mattson MP. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem*. 2002; 82(6): 1367-75.
- Lent R. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais da neurociência. São Paulo: Atheneu; 2004.
- Lillien L. Neural progenitors and stem cells: mechanisms of progenitor heterogeneity. *Curr Opin Neurobiol*. 1998; 8(1): 37-44.
- Lin Q, Li D, Xu X, Zou X, Fang L. Roles of TRPV1 and neuropeptidergic receptors in dorsal root reflex-mediated neurogenic inflammation induced by intradermal injection of capsaicin. *Mol Pain*. 2007; 3: 30.
- Liu SJ, Zukin RS. Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci*. 2007; 30(3): 126-34.
- Loescher AR, Smith KG, Robinson PP. Nerve damage and third molar removal. *Dent Update*. 2003; 30(7): 375-80, 82.
- Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci*. 2005; 6(8): 603-14.
- Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg*. 2005; 23(1): 3-9.
- Lubinska L. Early course of Wallerian degeneration in myelinated fibres of the rat phrenic nerve. *Brain Res*. 1977; 130(1): 47-63.
- Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am*. 2000; 25(3): 391-414.

- Lundborg G, Richard P. Bunge memorial lecture. Nerve injury and repair--a challenge to the plastic brain. *J Peripher Nerv Syst.* 2003; 8(4): 209-26.
- Luo H, Cheng J, Han JS, Wan Y. Change of vanilloid receptor 1 expression in dorsal root ganglion and spinal dorsal horn during inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant in rats. *Neuroreport.* 2004; 15(4): 655-8.
- Machado AV. *Neuroanatomia Funcional.* Rio de Janeiro; 1993. p. 361.
- Madeira MC. *Anatomia da Face.* 2.ED. São Paulo; 1997. p. 176.
- Malm-Buatsi E, Nepple KG, Boyt MA, Austin JC, Cooper CS. Efficacy of transcutaneous electrical nerve stimulation in children with overactive bladder refractory to pharmacotherapy. *Urology.* 2007; 70(5): 980-3.
- Marcol W, Kotulska K, Larysz-Brysz M, Kowalik JL. BDNF contributes to animal model neuropathic pain after peripheral nerve transection. *Neurosurg Rev.* 2007; 30(3): 235-43; discussion 43.
- Marzola C. *Fundamentos de Cirurgia Buco Maxilo Facial.* Bauru - SP: Ed. Independente; 2005.
- Matayoshi S, Jiang N, Katafuchi T, Koga K, Furue H, Yasaka T, Nakatsuka T, Zhou XF, Kawasaki Y, Tanaka N, Yoshimura M. Actions of brain-derived neurotrophic factor on spinal nociceptive transmission during inflammation in the rat. *J Physiol.* 2005; 569(Pt 2): 685-95.
- Matesz C, Modis L, Halasi G, Szigeti ZM, Felszeghy S, Bacskai T, Szekely G. Extracellular matrix molecules and their possible roles in the regeneration of frog nervous system. *Brain Res Bull.* 2005; 66(4-6): 526-31.
- Mattson MP. Glutamate and Neurotrophic Factors in Neuronal Plasticity and Disease In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008. p. 97–112
- McKenna M. C. GR, Sonnewald U., Waagepetersen H. S., Schousboe A. . Energy metabolism of the brain. In: Siegel G. J. ARW, Brady S.T. and Price D. L., eds, editor. *Basic Neurochemistry* Amsterdam: Elsevier; 2006. p. pp. 531–57.
- Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr.* 2000; 130(4S Suppl): 1007S-15S.
- Merighi A, Salio C, Ghirri A, Lossi L, Ferrini F, Betelli C, Bardoni R. BDNF as a pain modulator. *Prog Neurobiol.* 2008; 85(3): 297-317.
- Miletic G, Hanson EN, Miletic V. Brain-derived neurotrophic factor-elicited or sciatic ligation-associated phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the rat spinal dorsal horn is reduced by block of tyrosine kinase receptors. *Neurosci Lett.* 2004; 361(1-3): 269-71.
- Miletic G, Miletic V. Increases in the concentration of brain derived neurotrophic factor in the lumbar spinal dorsal horn are associated with pain behavior following chronic constriction injury in rats. *Neurosci Lett.* 2002; 319(3): 137-40.

- Miloro M, Halkias LE, Mallery S, Travers S, Rashid RG. Low-level laser effect on neural regeneration in Gore-Tex tubes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93(1): 27-34.
- Naff NJ, Ecklund JM. History of peripheral nerve surgery techniques. *Neurosurg Clin N Am.* 2001; 12(1): 197-209, x.
- Nagamine K, Ozaki N, Shinoda M, Asai H, Nishiguchi H, Mitsudo K, Tohnai I, Ueda M, Sugiura Y. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia induced by experimental squamous cell carcinoma of the lower gingiva in rats. *J Pain.* 2006; 7(9): 659-70.
- Nascimento PM. Efeito da variação da intensidade e do comprimento de onda do LASER não cirúrgico em feridas cirúrgicas em dorso de ratos: Estudo histológico São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2001.
- Navarro X, Vivo M, Valero-Cabre A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol.* 2007; 82(4): 163-201.
- Neubert JK, Maidment NT, Matsuka Y, Adelson DW, Kruger L, Spigelman I. Inflammation-induced changes in primary afferent-evoked release of substance P within trigeminal ganglia in vivo. *Brain Res.* 2000; 871(2): 181-91.
- Nomura H, Ogawa A, Tashiro A, Morimoto T, Hu JW, Iwata K. Induction of Fos protein-like immunoreactivity in the trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following noxious and non-noxious mechanical stimulation of the whisker pad of the rat with an inferior alveolar nerve transection. *Pain.* 2002; 95(3): 225-38.
- Obata K, Noguchi K. BDNF in sensory neurons and chronic pain. *Neurosci Res.* 2006; 55(1): 1-10.
- Obata K, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Mizushima T, Katsura H, Fukuoka T, Tokunaga A, Noguchi K. Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. *J Neurosci.* 2004; 24(45): 10211-22.
- Obata K, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Mizushima T, Katsura H, Fukuoka T, Tokunaga A, Noguchi K. The effect of site and type of nerve injury on the expression of brain-derived neurotrophic factor in the dorsal root ganglion and on neuropathic pain behavior. *Neuroscience.* 2006; 137(3): 961-70.
- Ogawa A, Dai Y, Yamanaka H, Iwata K, Niwa H, Noguchi K. Ca(2+)/calmodulin-protein kinase II α in the trigeminal subnucleus caudalis contributes to neuropathic pain following inferior alveolar nerve transection. *Exp Neurol.* 2005; 192(2): 310-9.
- Oliveira CMB, Issy AM, Sakata RK. Fisiopatologia da dor pós-operatória, in *Revista Brasileira de Medicina São Paulo - SP, Grupo Editorial Moreira Junior*, 2010, p. p.415-8.

- Ortiz MCSM-R, S. M.; Soares, E. G.; Parizotto, N. A.; . Influencia do LASER de baixa potência nos níveis das proteínas plasmáticas de coelhos. *Revista Brasileira de Fisioterapia*. 2001; 7(3): 187-94.
- Passafaro M, Nakagawa T, Sala C, Sheng M. Induction of dendritic spines by an extracellular domain of AMPA receptor subunit GluR2. *Nature*. 2003; 424(6949): 677-81.
- Pastore D, Greco M, Passarella S. Specific helium-neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase. *Int J Radiat Biol*. 2000; 76(6): 863-70.
- Patel NB. Physiology of pain. *Guide to pain management in low-resource settings*. Amsterdam: Internacional Association for the Study of Pain,. 2010: cap. 3, p.13-8.
- Pellitteri R, Russo A, Stanzani S. Schwann cell: a source of neurotrophic activity on cortical glutamatergic neurons in culture. *Brain Res*. 2006; 1069(1): 139-44.
- Perrot R, Berges R, Bocquet A, Eyer J. Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. *Mol Neurobiol*. 2008; 38(1): 27-65.
- Pezet S, Malcangio M, McMahon SB. BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways? *Brain Res Brain Res Rev*. 2002; 40(1-3): 240-9.
- Pezet S, McMahon SB. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci*. 2006; 29: 507-38.
- Pietrobon D, Striessnig J. Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci*. 2003; 4(5): 386-98.
- Pisera D. Fisiologia da dor, in Otero P, (ed): *Dor Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais*. São Paulo, Elsevier, 2005, p. p. 30-74.
- Platt CI, Krekoski CA, Ward RV, Edwards DR, Gavrilovic J. Extracellular matrix and matrix metalloproteinases in sciatic nerve. *J Neurosci Res*. 2003; 74(3): 417-29.
- Pomonis JD, Harrison JE, Mark L, Bristol DR, Valenzano KJ, Walker K. N-(4-Tertiarybutylphenyl)-4-(3-cholorphyridin-2-yl)tetrahydropyrazine -1(2H)-carbox-amide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: II. in vivo characterization in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 306(1): 387-93.
- Prado MMB. Estudo Sobre a Parestesia do Nervo Alveolar Inferior Pós Cirurgias de Terceiros Molares Inferiores São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.
- Prasad S, Galetta S. Trigeminal neuralgia: historical notes and current concepts. *Neurologist*. 2009; 15(2): 87-94.
- Prindeze NJ, Moffatt LT, Shupp JW. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012; 237(11): 1241-8.

- Prithviraj R, Kelly KM, Espinoza-Lewis R, Hexom T, Clark AB, Inglis FM. Differential regulation of dendrite complexity by AMPA receptor subunits GluR1 and GluR2 in motor neurons. *Dev Neurobiol*. 2008; 68(2): 247-64.
- Raghoobar GM, Meijndert L, Kalk WW, Vissink A. Morbidity of mandibular bone harvesting: a comparative study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007; 22(3): 359-65.
- Rashid MH, Inoue M, Kondo S, Kawashima T, Bakoshi S, Ueda H. Novel expression of vanilloid receptor 1 on capsaicin-insensitive fibers accounts for the analgesic effect of capsaicin cream in neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 304(3): 940-8.
- Ribeiro MSZ, D. M. Laser em Baixa Intensidade. *A Odontologia e o Laser*; 2004. p. 217.
- Ro JY, Lee JS, Zhang Y. Activation of TRPV1 and TRPA1 leads to muscle nociception and mechanical hyperalgesia. *Pain*. 2009; 144(3): 270-7.
- Robaina F, Clavo B. Spinal cord stimulation in the treatment of post-stroke patients: current state and future directions. *Acta Neurochir Suppl*. 2007; 97(Pt 1): 277-82.
- Robinson PP, Boissonade FM, Loescher AR, Smith KG, Yates JM, Elcock C, Bird EV, Davies SL, Smith PL, Vora AR. Peripheral mechanisms for the initiation of pain following trigeminal nerve injury. *J Orofac Pain*. 2004; 18(4): 287-92.
- Rochkind S. Phototherapy in peripheral nerve regeneration: From basic science to clinical study. *Neurosurg Focus*. 2009; 26(2): E8.
- Rochkind S, Drory V, Alon M, Nissan M, Ouaknine GE. Laser phototherapy (780 nm), a new modality in treatment of long-term incomplete peripheral nerve injury: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Photomed Laser Surg*. 2007a; 25(5): 436-42.
- Rochkind S, Nissan M, Alon M, Shamir M, Salame K. Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats. *Lasers Surg Med*. 2001; 28(3): 216-9.
- Rotenstein L, Herath K, Gould RM, de Bellard ME. Characterization of the shark myelin Po protein. *Brain Behav Evol*. 2008; 72(1): 48-58.
- Rui B, Guo S, Zeng B, Wang J, Chen X. An implantable electrical stimulator used for peripheral nerve rehabilitation in rats. *Exp Ther Med*. 2013; 6(1): 22-8.
- Sahbaie P, Shi X, Guo TZ, Qiao Y, Yeomans DC, Kingery WS, Clark JD. Role of substance P signaling in enhanced nociceptive sensitization and local cytokine production after incision. *Pain*. 2009; 145(3): 341-9.
- Satake H, Aoyama M, Sekiguchi T, Kawada T. Insight into molecular and functional diversity of tachykinins and their receptors. *Protein Pept Lett*. 2013; 20(6): 615-27.
- Schaefer AT, Larkum ME, Sakmann B, Roth A. Coincidence detection in pyramidal neurons is tuned by their dendritic branching pattern. *J Neurophysiol*. 2003; 89(6): 3143-54.

Schmidt CE, Leach JB. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annu Rev Biomed Eng.* 2003; 5: 293-347.

Scrivani SJ, Keith DA, Kaban LB. Temporomandibular disorders. *N Engl J Med.* 2008; 359(25): 2693-705.

Seeburg PH, Single F, Kuner T, Higuchi M, Sprengel R. Genetic manipulation of key determinants of ion flow in glutamate receptor channels in the mouse. *Brain Res.* 2001; 907(1-2): 233-43.

Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain.* 1990; 43(2): 205-18.

Sessle BJ. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11(1): 57-91.

Sessle BJ. Mechanisms of oral somatosensory and motor functions and their clinical correlates. *J Oral Rehabil.* 2006; 33(4): 243-61.

Sessle BJ. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. *Int Rev Neurobiol.* 2011; 97: 179-206.

Shakur SF, Bhansali A, Mian AY, Rosseau GL. Neurosurgical treatment of trigeminal neuralgia. *Dis Mon.* 2011; 57(10): 570-82.

Shamir MH, Rochkind S, Sandbank J, Alon M. Double-blind randomized study evaluating regeneration of the rat transected sciatic nerve after suturing and postoperative low-power laser treatment. *J Reconstr Microsurg.* 2001; 17(2): 133-7; discussion 8.

Shankland WE, 2nd. The trigeminal nerve. Part I: An over-view. *Cranio.* 2000; 18(4): 238-48.

Shen CC, Yang YC, Liu BS. Large-area irradiated low-level laser effect in a biodegradable nerve guide conduit on neural regeneration of peripheral nerve injury in rats. *Injury.* 2011; 42(8): 803-13.

Shimoyama M, Tanaka K, Hasue F, Shimoyama N. A mouse model of neuropathic cancer pain. *Pain.* 2002; 99(1-2): 167-74.

Shinoda M, Ogino A, Ozaki N, Urano H, Hironaka K, Yasui M, Sugiura Y. Involvement of TRPV1 in nociceptive behavior in a rat model of cancer pain. *J Pain.* 2008; 9(8): 687-99.

Silveira PC, Streck EL, Pinho RA. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2007; 86(3): 279-82.

Song M, Chen SZ, Han H, Xiong Y. An experimental study on repair of peripheral nerve injury by transplantation of microcapsulated NGF-expressing NIH 3T3 cells. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi.* 2005; 21(1): 53-7.

- Stein C, Clark JD, Oh U, Vasko MR, Wilcox GL, Overland AC, Vanderah TW, Spencer RH. Peripheral mechanisms of pain and analgesia. *Brain Res Rev.* 2009; 60(1): 90-113.
- Stoll G, Jander S, Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst.* 2002; 7(1): 13-27.
- Strauss ER, Ziccardi VB, Janal MN. Outcome assessment of inferior alveolar nerve microsurgery: a retrospective review. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 64(12): 1767-70.
- Sun RQ, Tu YJ, Lawand NB, Yan JY, Lin Q, Willis WD. Calcitonin gene-related peptide receptor activation produces PKA- and PKC-dependent mechanical hyperalgesia and central sensitization. *J Neurophysiol.* 2004; 92(5): 2859-66.
- Sun W, Sun C, Zhao H, Lin H, Han Q, Wang J, Ma H, Chen B, Xiao Z, Dai J. Improvement of sciatic nerve regeneration using laminin-binding human NGF-beta. *PLoS One.* 2009; 4(7): e6180.
- Suzuki M, Nelson AD, Eickstaedt JB, Wallace K, Wright LS, Svendsen CN. Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex. *Eur J Neurosci.* 2006; 24(3): 645-53.
- Suzuki R, Morcuende S, Webber M, Hunt SP, Dickenson AH. Superficial NK1-expressing neurons control spinal excitability through activation of descending pathways. *Nat Neurosci.* 2002; 5(12): 1319-26.
- Szundi I, Liao GL, Einarsdottir O. Near-infrared time-resolved optical absorption studies of the reaction of fully reduced cytochrome c oxidase with dioxygen. *Biochemistry.* 2001; 40(8): 2332-9.
- Takeda M, Tanimoto T, Ikeda M, Nasu M, Kadoi J, Shima Y, Ohta H, Matsumoto S. Temporomandibular joint inflammation potentiates the excitability of trigeminal root ganglion neurons innervating the facial skin in rats. *J Neurophysiol.* 2005b; 93(5): 2723-38.
- Takeda M, Tanimoto T, Nasu M, Ikeda M, Kadoi J, Matsumoto S. Activation of NK1 receptor of trigeminal root ganglion via substance P paracrine mechanism contributes to the mechanical allodynia in the temporomandibular joint inflammation in rats. *Pain.* 2005a; 116(3): 375-85.
- Tal M, Devor M. Ectopic discharge in injured nerves: comparison of trigeminal and somatic afferents. *Brain Res.* 1992; 579(1): 148-51.
- Tarsa L, Balkowiec-Iskra E, Kratochvil FJ, 3rd, Jenkins VK, McLean A, Brown AL, Smith JA, Baumgartner JC, Balkowiec A. Tooth pulp inflammation increases brain-derived neurotrophic factor expression in rodent trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience.* 2010; 167(4): 1205-15.
- Thompson DM, Buettner HM. Schwann cell response to micropatterned laminin surfaces. *Tissue Eng.* 2001; 7(3): 247-65.

- Thyboll J, Kortesmaa J, Cao R, Soininen R, Wang L, Iivanainen A, Sorokin L, Risling M, Cao Y, Tryggvason K. Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation. *Mol Cell Biol*. 2002; 22(4): 1194-202.
- Tominaga M. [Activation and regulation of nociceptive transient receptor potential (TRP) channels, TRPV1 and TRPA1]. *Yakugaku Zasshi*. 2010; 130(3): 289-94.
- Tong KC, Lo SK, Cheing GL. Alternating frequencies of transcutaneous electric nerve stimulation: does it produce greater analgesic effects on mechanical and thermal pain thresholds? *Arch Phys Med Rehabil*. 2007; 88(10): 1344-9.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76(9): 4350-4.
- Tranquilli WJ. Fisiologia da dor aguda. In: Greene S, editor. Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor. Porto Alegre: Artmed; 2004. p. 399-402.
- Tsuboi Y, Takeda M, Tanimoto T, Ikeda M, Matsumoto S, Kitagawa J, Teramoto K, Simizu K, Yamazaki Y, Shima A, Ren K, Iwata K. Alteration of the second branch of the trigeminal nerve activity following inferior alveolar nerve transection in rats. *Pain*. 2004; 111(3): 323-34.
- Tucker BA, Rahimtula M, Mearow KM. Integrin activation and neurotrophin signaling cooperate to enhance neurite outgrowth in sensory neurons. *J Comp Neurol*. 2005; 486(3): 267-80.
- Tuner J, Hode L. It's all in the parameters: a critical analysis of some well-known negative studies on low-level laser therapy. *J Clin Laser Med Surg*. 1998; 16(5): 245-8.
- Urano H, Ara T, Fujinami Y, Hiraoka BY. Aberrant TRPV1 expression in heat hyperalgesia associated with trigeminal neuropathic pain. *Int J Med Sci*. 2012; 9(8): 690-7.
- Varejao AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Melo-Pinto P, Raimondo S, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurotrauma*. 2004; 21(11): 1652-70.
- Veal EA, Day AM, Morgan BA. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell*. 2007; 26(1): 1-14.
- Vetter P, Roth A, Hausser M. Propagation of action potentials in dendrites depends on dendritic morphology. *J Neurophysiol*. 2001; 85(2): 926-37.
- Vos BP, Strassman AM. Fos expression in the medullary dorsal horn of the rat after chronic constriction injury to the infraorbital nerve. *J Comp Neurol*. 1995; 357(3): 362-75.
- Waite PM. Trigeminal Sensory System. In: Paxinos, G. The Rat Nervous System. Elsevier; 2003. p. 817-51.
- Waite PM, Ashwell, K. W. . Trigeminal Sensory System. In: Paxinos, G. The Rat Nervous System. Elsevier, ; 2004. p. 817-51.

- Walker KL, Yoo HK, Undamatla J, Szaro BG. Loss of neurofilaments alters axonal growth dynamics. *J Neurosci*. 2001; 21(24): 9655-66.
- Walker KM, Urban L, Medhurst SJ, Patel S, Panesar M, Fox AJ, McIntyre P. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 304(1): 56-62.
- Wang X, Luo E, Li Y, Hu J. Schwann-like mesenchymal stem cells within vein graft facilitate facial nerve regeneration and remyelination. *Brain Res*. 2011; 1383: 71-80.
- Watanabe I, Yamada E. The fine structure of lamellated nerve endings found in the rat gingiva. *Arch Histol Jpn*. 1983; 46(2): 173-82.
- Watson CP. Management issues of neuropathic trigeminal pain from a medical perspective. *J Orofac Pain*. 2004; 18(4): 366-73.
- Wong-Riley MT, Bai X, Buchmann E, Whelan HT. Light-emitting diode treatment reverses the effect of TTX on cytochrome oxidase in neurons. *Neuroreport*. 2001; 12(14): 3033-7.
- Wong-Riley MT, Liang HL, Eells JT, Chance B, Henry MM, Buchmann E, Kane M, Whelan HT. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem*. 2005; 280(6): 4761-71.
- Woolf CJ. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. *Life Sci*. 2004; 74(21): 2605-10.
- Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron*. 2007; 55(3): 353-64.
- Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*. 2000; 288(5472): 1765-9.
- Yajima Y, Narita M, Usui A, Kaneko C, Miyatake M, Yamaguchi T, Tamaki H, Wachi H, Seyama Y, Suzuki T. Direct evidence for the involvement of brain-derived neurotrophic factor in the development of a neuropathic pain-like state in mice. *J Neurochem*. 2005; 93(3): 584-94.
- Yang D, Bierman J, Tarumi YS, Zhong YP, Rangwala R, Proctor TM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Miner JH, Sherman LS, Gold BG, Patton BL. Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8. *J Cell Biol*. 2005; 168(4): 655-66.
- Yin Q, Kemp GJ, Yu LG, Wagstaff SC, Frostick SP. Expression of Schwann cell-specific proteins and low-molecular-weight neurofilament protein during regeneration of sciatic nerve treated with neurotrophin-4. *Neuroscience*. 2001; 105(3): 779-83.
- Yonehara N, Kudo C, Kamisaki Y. Involvement of NMDA-nitric oxide pathways in the development of tactile hypersensitivity evoked by the loose-ligation of inferior alveolar nerves in rats. *Brain Res*. 2003; 963(1-2): 232-43.

- Yoshimura M, Yonehara N. Alteration in sensitivity of ionotropic glutamate receptors and tachykinin receptors in spinal cord contribute to development and maintenance of nerve injury-evoked neuropathic pain. *Neurosci Res.* 2006; 56(1): 21-8.
- Yu WM, Chen ZL, North AJ, Strickland S. Laminin is required for Schwann cell morphogenesis. *J Cell Sci.* 2009; 122(Pt 7): 929-36.
- Yu WM, Yu H, Chen ZL. Laminins in peripheral nerve development and muscular dystrophy. *Mol Neurobiol.* 2007; 35(3): 288-97.
- Yu X, Bellamkonda RV. Tissue-engineered scaffolds are effective alternatives to autografts for bridging peripheral nerve gaps. *Tissue Eng.* 2003; 9(3): 421-30.
- Yu Y, Lundberg T, Yu LC. Role of calcitonin gene-related peptide and its antagonist on the evoked discharge frequency of wide dynamic range neurons in the dorsal horn of the spinal cord in rats. *Regul Pept.* 2002; 103(1): 23-7.
- Zakrzewska JM. Facial pain: an update. *Curr Opin Support Palliat Care.* 2009; 3(2): 125-30.
- Zeng X, Zhang L, Sun L, Zhang D, Zhao H, Jia J, Wang W. Recovery from rat sciatic nerve injury in vivo through the use of differentiated MDSCs in vitro. *Exp Ther Med.* 2013; 5(1): 193-6.
- Zhang H, Cang CL, Kawasaki Y, Liang LL, Zhang YQ, Ji RR, Zhao ZQ. Neurokinin-1 receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKCepsilon: a novel pathway for heat hyperalgesia. *J Neurosci.* 2007; 27(44): 12067-77.
- Zhang J, Xing D, Gao X. Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2008; 217(2): 518-28.
- Zhou XF, Deng YS, Xian CJ, Zhong JH. Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats. *Eur J Neurosci.* 2000; 12(1): 100-5.
- Zigmond MJ. Otto Loewi and the demonstration of chemical neurotransmission. *Brain Res Bull.* 1999; 50(5-6): 347-8.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983; 16(2): 109-10.
- Zochodne D.W. C, C. Neurotrophin and other growth factors in the regenerative milieu of proximal nerve stump tips. *J Anat* 2002; 196: 279—332.
- Zochodne DW. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle Nerve Suppl.* 2000; 9: S33-8.

ANEXOS:

A: BOLSA DE ESTÁGIO DE PESQUISA NO EXTERIOR (BEPE)

Faculty of Dentistry
University of Toronto

Dr. Barry J. Sessle,
Department of Oral Physiology,
Faculty of Dentistry, University of Toronto
124 Edward St, Toronto,
M5G 1G6 CANADA

Período de 01/07/2013 a 31/12/2013 – Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) Nº 2013/ 08705-3

O objetivo do estágio de curta duração no exterior foi aprender técnicas de eletrofisiologia por meio de registros extracelulares de neurônios no subnúcleo *caudalis* do trigêmeo em um modelo de inflamação pulpar. Um irritante, óleo de mostarda (OM), foi injetado na polpa do dente e buscou-se avaliar se este estímulo provocaria um comportamento sensorio-nociceptivo e também sensibilização central no subnúcleo *caudalis* do trigêmeo, também conhecido como corno dorsal medular (CDM) e se a infusão de isofagomina mais l-lactato seria capaz de prevenir essa sensibilização central.

A sensibilização central é um processo crucial subjacente ao aumento da excitabilidade neuronal das vias nociceptivas. Ele é refletido no aumento de atividade nociceptiva neuronal espontânea, tamanho do campo mecanoreceptivo, das respostas a estímulos mecânicos nocivos e de uma diminuição do limiar de ativação mecânica após lesão do tecido periférico e inflamação, e tem sido implicada no desenvolvimento e na manutenção de dor persistente (Iwata et al., 2011; Latremoliere; Woolf, 2009; Sessle, 2011; Woolf; Salter, 2000).

O cérebro dos mamíferos é altamente dependente de um fornecimento contínuo de oxigênio e glicose para a produção de energia através da glicólise (McKenna M. C., 2006). Dados recentes têm sugerido um papel fisiológico para glicogênio no suporte a excitabilidade axonal durante a estimulação de alta intensidade, onde o lactato derivado do glicogênio atua

como fonte de energia suplementar quando a glicose ambiente é insuficiente para atender às demandas de energia elevadas (Brown et al., 2003).

O envolvimento de glicogênio cerebral em sustentar a atividade neuronal foi anteriormente demonstrado e a inibição do transporte de lactato significativamente comprometeu a atividade neuronal durante a estimulação de alta frequência e limitada disponibilidade de glicose, sustentando a ideia de que a energia derivada do glicogênio é utilizada pelos neurônios (Brown et al., 2003). A isofagomina é um inibidor altamente específico da glicogênio-fosforilase.

O tratamento com isofagomina mais l-lactato intratecal atenuou significativamente a hipersensibilidade mecânica induzida por OM e os parâmetros de sensibilização central CDM, em comparação com tratamento com veículo intratecal. Continua superfusão i.t. de isofagomina mais l-lactato sobre CDM não afetou as propriedades neuronais nociceptivas iniciais.

Esta é a primeira documentação que a superfusão de isofagomina mais L-lactato atenua sensibilização central dos funcionalmente identificadas CDM neurônios nociceptivos induzidos por um modelo de dor inflamatória aguda orofacial, sugerindo que a inibição da atividade da glicogênio fosforilase do cérebro desempenham um papel importante no desenvolvimento e / ou manutenção da dor neuropática orofacial.

Faculty of Dentistry
University of Toronto

March 3, 2014

re: Daniel Martins

I have reviewed the final report of Daniel Martins, who undertook research studies in my laboratories at the University of Toronto last year. I approve the report that is an accurate reflection of his educational experience in Toronto whereby he learnt the fundamentals of handling and surgically preparing rodents for experimental studies and also learnt the basic techniques required for electrophysiological experiments related to orofacial pain mechanisms. He applied this knowledge in experiments involving electrophysiological recordings from functionally identified single neurons in the rodent brainstem. These experiments have provided novel data documenting the involvement of brainstem glycolytic processes in the hyperexcitability ['central sensitization'] of trigeminal pain-transmission neurons recorded in a rodent model of orofacial pain. This is an important finding that may lead to the development of new pharmacological approaches to treating orofacial pain states by targeting these glycolytic processes.

Yours sincerely

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Barry Sessle".

Barry J. Sessle
Professor and Canada Research Chair

B: ARTIGO PUBLICADO COM DADOS REFERENTES AO TRABALHO.

JOURNAL OF NEUROTRAUMA 30:1–7 (March 15, 2013)
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/neu.2012.2603

Laser Therapy and Pain-Related Behavior after Injury of the Inferior Alveolar Nerve: Possible Involvement of Neurotrophins

Daniel de Oliveira Martins,¹ Fabio Martinez dos Santos,^{1,2} Mara Evany de Oliveira,¹
Luiz R.G. de Brito,³ José Benedito Dias Lemos,⁴ and Marucia Chacur¹

Abstract

Nerve-related complications have been frequently reported in dental procedures, and a very frequent type of occurrence involves the inferior alveolar nerve (IAN). The nerve injury in humans often results in persistent pain accompanied by allodynia and hyperalgesia. In this investigation, we used an experimental IAN injury in rats, which was induced by a Crile hemostatic clamp, to evaluate the effects of laser therapy on nerve repair. We also studied the nociceptive behavior (von Frey hair test) before and after the injury and the behavioral effects of treatment with laser therapy (emitting a wavelength of 904 nm, output power of 70 Wpk, a spot area of $\sim 0.1 \text{ cm}^2$, frequency of 9500 Hz, pulse time 60 ns and an energy density of 6 J/cm^2). As neurotrophins are essential for the process of nerve regeneration, we used immunoblotting techniques to preliminarily examine the effects of laser therapy on the expression of nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). The injured animals treated with laser exhibited an improved nociceptive behavior. In irradiated animals, there was an enhanced expression of NGF (53%) and a decreased BDNF expression (40%) after laser therapy. These results indicate that BDNF plays a locally crucial role in pain-related behavior development after IAN injury, increasing after lesions (in parallel to the installation of pain behavior) and decreasing with laser therapy (in parallel to the improvement of pain behavior). On the other hand, NGF probably contributes to the repair of nerve tissue, in addition to improving the pain-related behavior.

Key words: BDNF; IAN; laser therapy; NGF; pain behavior

Introduction

LOW-LEVEL LASER THERAPY (LLLT) is commonly used for physical therapy purposes. Recently, a growing number of laboratory and clinical studies have shown that LLLT at extremely low energy doses (between 1 and 6 J/cm^2), when administered through a particular emission mode (continuous or pulsed), is capable of eliciting significant biological effects.¹ Therapeutic low-power laser, for example, accelerates wound healing,^{2,3} reduces pain symptoms, restores neural function after damage, improves bone healing and remodeling, normalizes hormonal function, stimulates endorphin release, and modulates the immune system.^{4,5}

Over the past 10 years, clinical knowledge has been reported regarding the beneficial effects of LLLT in the treatment of nerve injury after dental procedures.⁶ Among the complications involving nerve damage in dentistry, the inferior alveolar nerve (IAN) is the most commonly injured nerve that could result from traumatic local anesthetic injections and dental treatment, because of the

proximity of its course to the region of surgical extraction of third molar teeth. This is of great relevance to the dentist because IAN injury causes physiological and psychological disorders, involving disturbance of speech, eating, kissing, make-up application, shaving, and drinking,⁷ in addition to pain and frequent complete loss of sensation.⁸

Experimental studies have been developed to better understand the pathophysiological mechanisms of nerve regeneration and its complications. Nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) belong to a still-growing family of neurotrophic molecules collectively called "neurotrophins," which play an important role on survival, growth, and neural differentiation.⁹ NGF is involved in the development, maintenance, and regeneration of sensory and sympathetic nerves.¹⁰

The use of growth factors such as NGF has been studied for a long time in relation to neural injury. NGF can stimulate the response to nerve repair when delivered in particular ways.¹¹ NGF is produced and released by target tissues and uptaken in a retrograde

¹Department of Anatomy, Laboratory of Functional Neuroanatomy of Pain, ²Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, and ³School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁴University Nove de Julho, São Paulo, Brazil.