Mara Evany de Oliveira Silva

**Avaliação da radiação LASER AsGa 904nm sobre o processo algico no modelo
de dor neuropática em ratos**

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

São Paulo
2014

Mara Evany de Oliveira Silva

**Avaliação da radiação LASER AsGa 904nm sobre o processo algico no modelo
de dor neuropática em ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Marucia Chacur

Versão original

São Paulo
2014

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

Silva, Mara Evany de Oliveira.

Avaliação da radiação Laser AsGa 904nm sobre o processo algico no modelo de dor neuropática em ratos / Mara Evany de Oliveira Silva. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Marucia Chacur.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Aspectos neuroanatômicos da fisiopatologia da dor em modelos comportamentais e eletrofisiológicos *in vivo*.

Versão do título para o inglês: Evaluation of radiation Laser AsGa 904nm on the pain process in the neuropathic pain model in rats.

1. Hiperalgesia 2. Dor neuropática 3. Laser de baixa intensidade 4. Receptores opioides 5. Substância P 6. Citocinas I. Chacur, Profa. Dra. Marucia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0184/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mara Evany de Oliveira Silva.

Título da Dissertação: Avaliação da radiação Laser AsGa 904nm sobre o processo
álgico no modelo de dor neuropática em ratos.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

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, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **010** nas fls. **02** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Marucia Chacur**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Avaliação da radiação LASER AsGa 904nm sobre o processo algico no modelo de dor neuropática em ratos*" do qual participam o(s) aluno(s), **Mara Evany de Oliveria Silva**, 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 **03.04.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 05 de abril de 2013.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho à minha família, ao meu esposo e em especial à minha mãe por ter sido um exemplo de mulher e a melhor mãe do mundo durante toda a sua existência.

Obrigada ♥

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que estiveram ao meu lado durante esta jornada e que de alguma forma me ajudaram a tornar tudo isso possível.

Agradeço ao bom Deus por ter me dado oportunidade e saúde para realizar esse sonho, pois acredito que tudo só acontece com a permissão divina.

À minha mentora intelectual, Profa. Dra. Marucia Chacur, pela orientação, apoio, incentivo constante e confiança, a quem serei eternamente grata pela oportunidade de compor a equipe Neurodor. “Maru”, você é uma pessoa incrível, excelente profissional e acima de tudo uma pessoa com quem podemos sempre contar, tanto no âmbito profissional quanto no pessoal. Você tem toda minha admiração, obrigada pelos “empurrões e puxões de orelha”, que me fizeram ser mais independente e perder o medo de lutar pelos meus ideais, saiba que mesmo com as dificuldades no decorrer do desenvolvimento deste projeto, os meus dias no “lab” foram muito felizes e especiais, sou muito grata a Deus por ter colocado você e o Neurodor em meu caminho, espero conseguir um dia ser como você chefe. Obrigada!

Aos meus amigos da família neurodor, Prizoca, Lili (Patati), Rê, que me ensinou tantas coisas no lab, você mora em meu coração “Rezilda”, Jojó, Mizinha minha querida pretinha, uma lady, a qual sempre procuro me espelhar, Alyne, Bianca “Bi”, Rafa, Igor “gatenho”, Dani meu companheiro de todas as horas, aguentou meus choros, meu devaneios muito loucos, sempre ao meu lado me apoiando. Dan, de longe você é umas das melhores pessoas que Deus poderia ter colocado em minha vida. Fabio, meu querido ex-professor da graduação, pessoa especial que me apresentou o que é a ciência, acreditou em mim, acompanhou meu crescimento, riu das minhas loucuras e me apoiou nos momentos difíceis no decorrer do projeto, muito obrigada Fá!!! tenho uma dívida eterna com você. Meus queridos amigos neurodor, obrigada por tudo, pois vocês estiveram e estão comigo todos esses dias acertando e errando experimentos e discutindo sobre a ciência.... más, muito além disso, que me fizeram rir todos os dias, me abraçaram e me apoiaram em todo o tempo. Vocês são de longe os melhores amigos que eu poderia pedir. Amo muito vocês. ♥

Aos meus amigos do departamento, especialmente a Manuela “Manuzita” a qual tive afinidade desde o princípio, e acredito que quando a pessoa é do bem a alma logo gera uma

conexão positiva, Manu, saiba que você também é parte da família neurodor, se o mundo tivesse mais pessoas assim como você ele com certeza seria bem melhor.

À Comissão de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais e ainda a todos os profissionais do departamento por terem dado suporte para a realização deste projeto, do início ao fim. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro para realização deste projeto.

Agradeço ainda aos meus amigos da faculdade, Elton que me apoiou e dedicou horas dos seus sagrados finais de semana comigo na biblioteca, amore você é muito especial em minha vida, meu querido amigo companheiro eu te amodoro!!!. Jéssica minha gazela favorita, com quem pude dar muitas risadas. Paty e Sthe minhas amigas e companheiras de estágio e para a vida toda, amo vocês meninas ♥. Somos a prova viva de que o amor de verdade e a afinidade entre as pessoas queridas supera até a distância.

Agradeço acima de tudo à minha família, que se mostrou tão forte no momento mais difícil da vida de todos nós. Sou muito grata a Deus pela linda e estruturada família que somos, pois sem ele não sei o que seria de nós. Vocês são meu suporte, minha base, meu chão. É um amor incondicional que não cabe nas palavras.

Meus maravilhosos irmãos amo muito todos vocês!!!. Agradeço a Deus por ter me dado também minha irmã Irani “Nia” não sei o que seria de mim minha querida se não fosse você, que é sem dúvida minha companheira, minha amiga, confidente e minha coluna forte, te amo mana, e todos os dias agradeço a Deus por ter me dado a melhor irmã do mundo. Agradeço à minha cunhada Rosângela “Rô”, que é uma irmã pra mim, que me aconselha com suas sábias palavras, sem dúvida você é a melhor cunhaimã Te Amo.

Agradeço aos meus sobrinhos queridos pelas horas agradáveis ao qual me desconecto um pouco dos meus problemas.

Agradeço também ao meu querido esposo Marcelo, por ser o melhor homem do mundo, compreensivo, companheiro, incentivador enfim... Filho, obrigada pelo seu amor incondicional pelos empurrões, e por não me deixar perder pra mim mesma, você não sabe o quanto efeito que esta frase fez e faz na minha vida. Obrigada meu amor por tudo, você é um presente de Deus para a minha vida!!! TE AMO ♥

“A dor possui um grande poder educativo: faz-nos melhores, mais misericordiosos, mais capazes de nos recolher em nós mesmos e persuade-nos de que a vida não é apenas divertimento, mas também um dever.”

Cesare Cantú

RESUMO

Oliveira ME. Avaliação da radiação LASER AsGa 904nm sobre o processo algico no modelo de dor neuropática em ratos. [Mestrado (Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A literatura relata que a técnica de laserterapia é um método não-invasivo que demonstra clinicamente ser eficaz na redução da sensibilidade à dor, e consequentemente na melhoria da qualidade de vida de pacientes com dor neuropática. O presente estudo visou examinar os efeitos da aplicação do LASER sobre a sensibilidade dolorosa induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI) de ratos Wistar. A cirurgia foi realizada em ratos machos adultos, submetidos posteriormente a dez sessões de laserterapia iniciadas 14 dias após a CCI. Ao finalizarmos o tratamento com LASER e os ensaios comportamentais, os animais foram eutanasiados e os gânglios das raízes posteriores (L4-L6) foram retirados. Os gânglios (DRG's de L4-L6) foram processados pela técnica de *Western blot* para a detecção dos receptores opióides MOR (μ), DOR (δ) e KOR (k), e da síntese de substância P (SP). Utilizamos também a técnica de ELISA para a análise de citocinas pró e anti-inflamatórias no soro sanguíneo. Nossos resultados referentes aos testes comportamentais, apontam para uma melhora no grupo CCI+LASER quando comparamos com o grupo CCI (sem tratamento). Quanto aos nossos ensaios de *Western Blot*, nossos resultados demonstram um aumento na densidade óptica para SP nos animais submetidos a CCI, e uma diminuição após tratamento com LASER. Não foi possível observar diferença estatística na análise dos receptores opióides entre os grupos experimentais e controles. Na análise do soro sanguíneo por meio da técnica de ELISA, observamos uma diminuição de interleucina 1 β e Fractalcina que são citocinas pró inflamatória no grupo tratado com LASER em comparação ao grupo CCI. Observamos uma tendência ao aumento de interleucina 10 que é uma citocina anti-inflamatória, o que corrobora com nossos testes comportamentais onde os animais apresentam aumento do limiar nociceptivo. Baseado em nossos resultados, podemos concluir que o LASER age na modulação da dor neuropática diminuindo a liberação da substância P e de citocinas pro-inflamatórias, além de aumentar a produção de interleucina 10, ocasionando em uma reversão da hipernocicepção dos animais submetidos à dor neuropática crônica.

Palavras-chave: Hiperalgisia. Dor Neuropática. LASER de baixa intensidade. Receptores opióides. Substância P. Interleucina 1 β . Interleucina 10. Fractalcina.

ABSTRACT

Oliveira ME. Evaluation of 904nm AsGa LASER radiation on the pain process in the neuropathic pain model in rats. [Masters thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

The literature reports that laser therapy technique is a non-invasive method that demonstrates be clinically effective in reducing pain sensitivity, and improve the quality of life of patients with neuropathic pain. This study aimed to examine the effects of the application of LASER on pain sensitivity induced by chronic constriction of the sciatic nerve (CCI) in Wistar rats. Surgery was performed in adult male rats subsequently subjected to ten sessions of laser therapy initiated 14 days after CCI. As we finished with LASER treatment and behavioral testing, the animals were euthanized and the dorsal root ganglions (L4-L6) were removed. The ganglions (DRG's L4-L6) were processed for Western blot for detection of opioid receptors MOR (μ), DOR (δ) and KOR (κ) and the synthesis of substance P (SP). We also used the ELISA technique for the analysis of pro- and anti-inflammatory cytokines in the blood serum. Our results regarding the behavioral tests point to an improvement in the CCI + LASER group when compared with the CCI group (no treatment). Western blot assays results demonstrate an increase in optical density for SP in animals subjected to CCI, and a decrease after treatment with LASER. No statistical difference was observed in the analysis of opioids receptors between the experimental and control groups. In the analysis of the blood serum by ELISA, we observed a decrease of interleukin 1 β and fractalkine which are pro-inflammatory cytokines in the group treated with LASER compared to the CCI group. We observed an increased in interleukin-10 an anti-inflammatory cytokine, which corroborates with behavioral tests where animals increased the nociceptive threshold. Based on our results, we conclude that LASER acts in the modulation of neuropathic pain due to decreasing the release of substance P and pro-inflammatory cytokines while increasing the production of interleukin-10, resulting in a reversal of hypernociception in animals subjected to chronic neuropathic pain model.

Keywords: Hyperalgesia. Neuropathic Pain. Low Level Laser Therapy. Opioid receptors. Substance P. Interleukin 1 β . Interleukin 10. fractalkine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cadeia de transporte de elétrons.....	24
Figura 2 – Ilustração do modelo de injúria por constrição crônica.....	30
Figura 3 – Ilustração do teste de pressão de pata.....	32
Figura 4 – Ilustração do teste de estimulação tátil – Filamentos de Von Frey.....	33
Figura 5 – Ilustração do teste de hiperalgesia térmica – Hargreaves.....	34
Figura 6 – Ilustração do tratamento com a técnica de laserterapia adaptada no Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor.....	35
Figura 7 – Efeito da técnica de laserterapia sob a resposta nociceptiva nos ratos com lesão do nervo isquiático.....	39
Figura 8 – Efeito da técnica de laserterapia após lesão (CCI) sobre o limiar tátil em ratos.....	40
Figura 9 – Efeito da técnica de laserterapia sob a resposta nociceptiva (estimulação térmica) nos ratos com lesão no nervo isquiático.....	41
Figura 10 – Efeito do anestésico inalatório sob a resposta nociceptiva nos animais submetidos a CCI.....	42
Figura 11 – Efeito da duração do LASER após pausa no tratamento sobre a resposta nociceptiva nos animais submetidos a CCI.....	44
Figura 12 – Efeito da técnica de laserterapia na síntese da Substância P no gânglio da raiz posterior de ratos.....	46
Figura 13 – Efeito da técnica de laserterapia sobre os receptores opióides MOR, DOR e KOR no gânglio da raiz posterior de ratos com CCI.....	47

Figura 14 – Efeito da técnica de laserterapia na modulação da liberação da interleucina 1 β no soro sanguíneo.....	48
Figura 15 – Efeito do tratamento com LASER na modulação da liberação da fractalcina no soro sanguíneo.....	49
Figura 16 – Efeito da técnica de laserterapia na modulação da liberação de interleucina 10 no soro sanguíneo.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

14d	Décimo quarto dia
Apoptose	Morte celular programada
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro)
CCI	Chronic Constriction Injury (Injúria por Constricção Crônica)
CCI LASER	Injúria por Constricção Crônica tratado com LASER
DRG	Dorsal Root Ganglion (Gânglio da Raiz Dorsal- Posterior)
FKN	Fractalkine (Fractalcina)
IL	Interleucina
IL- 1 β	Interleucina um beta
IL-4	Interleucina quatro
IL-6	Interleucina seis
IL-10	Interleucina dez
L4	Quarta Vértebra Lombar
L5	Quinta Vértebra Lombar
L6	Sexta Vértebra Lombar
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> – Amplificação da luz por emissão de Radiação Estimulada
LBI	LASER de baixa intensidade
MF	Medida Final
MI	Medida Inicial
NGF	Fator de Crescimento Neural
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Dor neuropática.....	16
1.2 Modelos experimentais para indução de dor neuropática.....	17
1.3 A influência do sistema opióide endógeno no controle da dor.....	18
1.4 Participação da substância P na dor.....	20
1.5 Participação das citocinas pró e anti-inflamatórias no controle da dor.....	21
1.6 LASER 904nm como potencial terapêutico na dor neuropática.....	23
1.7 Justificativa e hipótese.....	26
1.8 Objetivos.....	27
1.8.1 <i>Objetivo geral</i>	27
1.8.2 <i>Objetivos específicos</i>	27
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1 Animais.....	29
2.2 Indução da dor neuropática.....	29
2.3 Planejamento dos grupos experimentais.....	30
2.4 Avaliação da sensibilidade dolorosa.....	31
2.4.1 <i>Determinação da hiperalgesia mecânica</i>	31
2.4.2 <i>Determinação da alodinia mecânica</i>	32
2.4.3 <i>Determinação da hiperalgesia térmica</i>	33
2.5 Procedimento terapêutico- Técnica de laserterapia.....	34
2.6 Ensaio de <i>Western Blot</i>	36
2.7 Ensaio imunoenzimático para dosagem de ELISA.....	37
2.8 Análise estatística.....	38
3 RESULTADOS.....	39
3.1 Efeito da técnica de laserterapia sobre a nocicepção induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI).....	39
3.1.1 <i>Efeito na hiperalgesia mecânica</i>	39
3.1.2 <i>Efeito na alodinia mecânica</i>	40
3.1.3 <i>Efeito na hiperalgesia térmica</i>	41

3.2 Efeito do anestésico inalatório sobre a nocicepção induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI).....	42
3.3 Efeito da duração da laserterapia induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI) após pausa no tratamento.....	43
3.4 Efeito do LASER nos parâmetros celulares por meio dos ensaios de <i>Western Blot</i>	45
3.4.1 Substância P no gânglio da raiz posterior (DRG) segmento L4 – L6.....	45
3.4.2 Análise dos receptores opióides MOR, DOR e KOR no gânglio da raiz posterior (DRG) segmento L4 – L6.....	46
3.5 Efeito do LASER sobre a liberação de citocinas pró e anti-inflamatória no soro sanguíneo por meio da técnica de ELISA.....	48
3.5.1 Análise da interleucina 1 β	48
3.5.2 Análise da fractalcina.....	49
3.5.3 Análise da interleucina 10.....	50
4 DISCUSSÃO	51
5 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor Neuropática

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) em 1986 definiu a dor como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tecidual real ou potencial descrita em termos de tal dano”(Biro, 2010). Segundo a definição da NeuPSIG (Grupo de Interesse Especial de Dor Neuropática) em 2008 definiu a dor neuropática sendo uma dor que surge em consequência direta de uma lesão ou doença que afeta o sistema somatosensorial (Treede et al., 2008).

A lesão do nervo espinal em humanos resulta muitas vezes em dor persistente ou crônica, caracterizada por dor espontânea em queimação, acompanhada de alodinia (dor em resposta a estímulos não lesivos) e hiperalgesia (dor exagerada em resposta a estímulos lesivos) (Payne, Norfleet, 1986).

A ocorrência de lesões no sistema nervoso periférico (SNP) e na medula espinal contribui para o desenvolvimento da dor neuropática. Estas incluem a presença de focos ectópicos de lesão nas fibras nervosas periféricas, as quais mantêm contínuos os impulsos nervosos aferentes para o sistema nervoso central (SNC). Estes fatos associados à sensibilização central na vigência de lesão de nervos espinais contribuem para o desenvolvimento da dor neuropática (Devor, Seltzer, 1999; Schaible, 2007). Lesões no sistema nervoso periférico (SNP) além de causar alterações periféricas como, por exemplo, perda de força muscular, também pode alterar regiões subcorticais no sistema nervoso central (SNC), desencadeando estímulos prolongados em aferentes primários e assim sensibilizando o SNC, podendo ocasionar uma redução do limiar nociceptivo ou, ao aumento das respostas aos impulsos aferentes, contribuindo assim para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática (Campbell et al., 1988; Julius, Basbaum, 2001; Woolf, 2011).

Na prática clínica, tem sido extensivamente reportado que a dor neuropática é de difícil tratamento devido ao não entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento e manutenção deste tipo de dor (Aley, Levine, 2002; Sah et al., 2003).

Estudos apontam que pacientes que sofrem desse mal, tem sua qualidade de vida afetada psicossocialmente já que eles apresentam quadro de depressão e ansiedade, uma vez que os pacientes tendem a evoluir de forma diferente ao tratamento, devido à intensidade da dor que

muitas vezes é incapacitante, e que esse tipo de patologia não segue o que está descrito em livros didáticos e tem variações significativas entre os grupos de pacientes que são diagnosticados com dor neuropática (Dworkin et al., 2003; Schmid et al., 2013).

As opções terapêuticas para o controle deste tipo de dor têm aumentado nos últimos anos (Galer, 1995). Entretanto a resposta dos pacientes com dor neuropática para muitos dos tratamentos não tem sido satisfatória, pois os medicamentos empregados na clínica na maioria das vezes, não combatem a dor neuropática de forma eficaz para todos os pacientes. Nesse sentido, os tratamentos utilizados na prática clínica incluem: neurocirurgias como, –ablação neural, medicamentosos como, ansiolíticos, antidepressivos, anticonvulsivantes, administração sistêmica de anestésicos, analgésicos narcóticos e não narcóticos (Galer, 1995; Sah et al., 2003); e tratamento não medicamentoso tal como recursos utilizados na fisioterapia.

Dentre os tratamentos não medicamentosos, destaca-se a técnica de laserterapia a qual que tem se mostrado eficaz no controle das mais diversas síndromes álgicas, com, por exemplo, no controle da dor lombar crônica, neuralgia trigeminal entre outras (Bjordal et al., 2003; Martins et al., 2013; Medalha et al., 2012).

1.2 Modelos experimentais para indução de dor neuropática

Na literatura encontramos diferentes modelos animais para a indução da dor neuropática, os quais têm sido desenvolvidos para testar e comparar diversos tipos de fármacos e para auxiliar num melhor entendimento do seu mecanismo de ação. Considerando que esses modelos induzem alterações comportamentais nos roedores, como hiperalgesia, alodinia e dor espontânea, similares aos sintomas observados durante a dor neuropática em humanos, estudos que utilizam estas ferramentas e descrevem os diversos processos fisiopatológicos periféricos e centrais, que ocorrem após a lesão de nervo, podem ser a base que permite delinear os mecanismos da dor neuropática (Backonja, 2003). Estes modelos podem ser divididos em: 1) modelos de neuropatia periférica induzida por doença, nos quais se incluem a dor neuropática acarretada por diabetes Mellitus e o modelo de neuralgia pós-herpética; 2) modelos de dor central, os quais consistem em lesão da medula espinal, que pode ser por contusão, lesão fotoquímica ou agentes citotóxicos; 3) modelos de lesão de nervos espinais, tais como neuroma, lesão por constrição crônica (*chronic constriction injury* – CCI), ligação parcial do nervo isquiático, ligação de nervos espinais,

crioneurólise do isquiático, ressecção do ramo caudal inferior e neurite inflamatória do isquiático (Wang, Wang, 2003). A transecção total ou ligação do nervo isquiático reproduzem as condições clínicas de amputação, enquanto que a CCI do isquiático, por possuir ligaduras ao redor do nervo, simula as condições clínicas de compressão nervosa crônica, como a irritação da medula espinal induzida por hérnia de disco lombar (Zimmermann, 2001). Esses sintomas iniciam-se do 1° ao 5° dia após a indução da lesão, e se estendem por, pelo menos, dois meses (Bennett, Xie, 1988). As alterações estruturais envolvem degeneração de todas as fibras A e a maioria das fibras C (Basbaum et al., 1991). Assim, acreditamos que o modelo de indução da dor neuropática que consiste em quatro amarraduras frouxas ao redor do nervo isquiático (Bennett, Xie, 1988) possui grande aproximação clínica como, por exemplo, nos casos síndrome do túnel do carpo ou compressão do nervo isquiático, sendo, portanto, utilizada em nosso projeto de pesquisa para caracterizar os sinais da neuropatia periférica.

1.3 A influência do sistema opióide endógeno no controle da dor

Os opióides são analgésicos fortíssimos que exercem efeitos farmacológicos e fisiológicos devido à interação com receptores distribuídos em diversas regiões. Esses receptores são constituídos por sete domínios transmembrânicos e seu mecanismo de ação está associado à presença de proteína G inibitória, a qual quando ativada inibe a produção do AMP cíclico ou age diretamente sobre canais iônicos da membrana celular (canais de potássio e cálcio) diminuindo a excitabilidade neural, bem como a liberação de neuropeptídeos como, por exemplo, substância P e calcitonina (Stein, Zöllner, 2009; Yaksh, 1988). Na literatura encontramos três subtipos de receptores opióides, são eles: MOR (μ), DOR (δ) e KOR (κ), todos amplamente distribuídos em diversos sistemas como, por exemplo, no sistema imunológico, neuroendócrino (pineal e suprarrenal), em células ectodermis, sistema nervoso periférico e sistema nervoso central, modulando a dor e a inflamação (Zöllner, Stein, 2007).

No sistema nervoso periférico os receptores MOR, DOR e KOR são encontrados no gânglio da raiz posterior (Coggeshall et al., 1997; Mansour et al., 1994). Os primeiros indícios sobre a participação desses receptores na analgesia periférica surgiu em 1987 por reduzir a hiperalgesia quando se aplicava um agonista para esses receptores, sugerindo uma diminuição das descargas espontâneas nas fibras do tipo C de neurônios aferentes primários (Russell et al., 1987;

Sánchez et al., 2010; Tegeder et al., 2003). Na literatura, encontramos diversos estudos demonstrando o envolvimento de agonistas para receptores opióides como alvo para o controle da dor neuropática. São exemplos: Oxicodona e morfina (Thibault et al., 2014). Neste sentido alguns fármacos têm sido estudados para entender quanto ao seu mecanismos de ação e a participação na regulação e consequente diminuição da dor neuropática, um exemplo disso é a oxicodona, que é um agonista para receptor de opióide MOR uma droga mais eficaz que a morfina, esse potente fármaco foi administrado em ratos com dor neuropática induzida por vincristina que é um quimioterápico, foi utilizado uma técnica de DNA microarray onde foi mensurado no gânglio da raiz dorsal um aumento da regulação de receptores gabaérgicos nos neurônios sensoriais, neurônios que são transportados para o corno dorsal da medula espinal de forma retrógrada para que ocorra uma inibição do sinal doloroso (Thibault et al., 2014).

Entretanto, a morfina vem sendo utilizada com alta frequência no tratamento da dor neuropática, porém, este medicamento apresenta efeitos colaterais como. por exemplo, a depressão do sistema respiratório, constipação intestinal, além de ser dose dependente, sendo preciso aumentar sua dose de tempos em tempos, para que seu efeito analgésico seja mantido (Thibault et al., 2014).

No intuito de melhor compreensão sobre os mecanismos que envolvem a dor neuropática, entre 1970 a 1980 surgiu a idéia sobre a participação de regiões encefálicas na modulação da aferência nociceptiva primária advinda do sistema nervoso periférico (Mayer et al., 1971). Diversos estudos apontam que a estimulação elétrica da Sustância Cinzenta Periaquedutal (PAG) induz intensa analgesia em ratos (Mayer, Price, 1976; Mayer et al., 1971). A PAG se dispõe anatomicamente numa série de colunas neuronais longitudinais orientadas de forma rostrocaudal como, por exemplo, coluna dorsomedial, coluna dorsolateral, coluna lateral, coluna medial e por fim, coluna ventrolateral (Paxinos, Watson, 2007). A coluna ventrolateral da PAG ficou marcada por ser a principal região responsável pela liberação de opióides endógenos (Basbaum, Fields, 1984), sendo uma região estabelecida para entender a relação do sistema inibitório descendente de dor sobre a aferência nociceptiva primária em fibras C (Gebhart, 2004; Waters, Lumb, 2008). Além disso, a PAG é responsável pela projeção de grupos de neurônios para a região da medula rostral ventromedial (RVM) local em que encontramos os núcleos: magno da rafe, núcleo reticular gigantocelular e gigantocelular lateral (Fields et al., 1991). Assim, uma retransmissão dos impulsos advindos da PAG para a RVM são retransmitidos para a medula espinal, via

funículo dorsolateral causando atenuação da aferência nociceptiva primária por meio ativação das células OFF (gabaérgica) e inibição da células ON (Wall, Melzack, 1999) local em que opióides e substância P desempenham papel fundamental no controle direto e indireto sobre a modulação descendente da dor (Pinto et al., 2008).

1.4 Participação da substância P na dor

Para melhor compreensão do nosso estudo, decidimos investigar o envolvimento da substância P (SP), uma vez que sabemos que neurônios do sistema nervoso a sintetizam. A substância P é um neuropeptídeo, que tem sua ação em um receptor que tem em sua constituição sete domínios transmembrânicos, denominado receptor NK1 ao qual está acoplado à proteína G. O envolvimento do receptor NK1 em um modelo de dor neuropática do nervo isquiático (CCI), foi citado em alguns estudos sugerindo que a SP é responsável pelo desenvolvimento de hiperalgesia em ratos (Jang et al., 2004; Lee, Kim, 2007) e que quando esses receptores são bloqueados reverte esse quadro (Cahill,Coderre, 2002).

Vachon et al. (2013) utilizaram camundongos em um modelo de dor neuropática crônica, onde o nervo fibular e tibial foram amarrados, os animais foram separados em gaiolas com enriquecimento e empobrecimento do ambiente, os animais também foram submetidos a testes comportamentais, aos quais foi observado uma diminuição do limiar nociceptivo dos animais que ficaram em gaiolas empobrecidas quando comparados aos animais que tiveram seu ambiente enriquecido, após a eutanásia desses animais a medula espinal foi analisada para a detecção dos níveis de substância P e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), os animais em condições de ambiente empobrecido houve um aumento dos níveis dessas substâncias quando comparados com os animais que tiveram um enriquecimento do seu ambiente, esse estudo tem uma grande relevância pois é dito na literatura que o paciente portador de dor neuropática, tem seu convívio social comprometido, e a capacidade de reverter o estilo de vida de pacientes portadores dessas síndromes tem também uma significativa implicação terapêutica (Vachon et al., 2013).

Bertolini et al. (2011) fizeram um estudo em ratos com modelo de constrição do nervo isquiático, após o terceiro dia da cirurgia, os pesquisadores submeteram os animais á cinco dias de tratamento com LASER de baixa intensidade, a dor desses animais foi observada por meio do

tempo de elevação da pata durante a marcha, foi observado que nos animais sem tratamento mantiveram a pata elevada mais tempo do que os animais submetidos ao tratamento, com isso os autores concluíram que o LASER é eficaz para o tratamento da ciatalgia, com uma significativa redução do quadro álgico (Bertolini et al., 2011).

Em um estudo feito por Bashiri (2013), com sessenta pacientes portadores de neuropatia diabética submetidos ao tratamento com de LASER de baixa intensidade e posteriormente avaliados por meio da escala visual analógica relataram melhora significativa após a laserterapia (Bashiri, 2013).

Neste sentido Beckmann et al. (2014), submeteram pacientes com úlceras crônicas de pés diabéticos ao tratamento com LASER de baixa intensidade. Os autores concluíram que o tratamento com laser foi eficaz por inibir a liberação de prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias, bem como por induzindo o aumento da microcirculação propiciando assim influxo de nutrientes que poderão contribuir para o tratamento de diversas síndromes dolorosas (Beckmann et al., 2014).

1.5 A participação das citocinas Pró e Anti-inflamatórias no controle da dor

Interleucinas (IL) são proteínas (polipeptídeos) envolvidas na comunicação entre linfócitos (Lichtman, 2007). Algumas IL's são produzidas por várias células não leucocitárias, suas atividades podem ser resumidas em: reconhecimento de antígenos por células T (tem função de coordenar a defesa imunológica contra: bactérias, vírus e fungos), aumento da proliferação de células T ativadas, atração de macrófagos e identificação de mecanismos efetivos para fagocitose de microrganismos, e na promoção da eritropoiese. As interleucinas são grupos de proteínas produzidas por células T, muitas dessas IL estão envolvidas na ativação dos linfócitos, sendo que cada interleucina tem sua atuação sobre grupos específicos de células que expressam receptores adequados para cada interleucina que são identificadas por números: IL-1, IL-4, IL-6, IL-10 (Lichtman, 2007).

Kraychete et al. (2009), em seu estudo analisou por meio de amostras sanguíneas os níveis citocinas pró-inflamatórias no plasma de pacientes com e sem dor neuropática, e constatou que pacientes portadores de neuropatias apresentavam maiores níveis destas citocinas (Kraychete et al., 2009).

Kukkar et al. (2012), num modelo de dor neuropática (CCI), observaram no grupo experimental um nível elevado de TNF- α no nervo isquiático e após o tratamento com aliscireno (25 e 50 mg / kg), esses níveis foram significativamente reduzidos com consequente melhora da dor (Kukkar et al., 2012).

Pacientes com dor neuropática apresentam grandes dificuldades de tratamento na clínica, pois são acompanhados de condições debilitantes e dor persistente. Lesões dos nervos periféricos induzem a gliose, que contribuem para a sensibilização central, com consequente melhora da comunicação entre células da glia e neurônios do DRG, promovendo assim a manutenção da dor neuropática gerando impulsos nociceptivos contínuos (Clark, Malcangio, 2014).

Na literatura encontramos hipóteses de que neurotransmissores agem na manutenção e facilitação da dor neuropática, entre as mais diversas substâncias podemos citar a fractalcina (FKN) (Milligan et al., 2005).

A fractalcina é uma citocina que fica presa na parede da superfície extracelular dos neurônios, tendo seu receptor CXCR1 expresso em microglia, hoje em dia sabe-se que as células da glia além de fazer a sustentação e nutrição do sistema nervoso, também participam da ativação e manutenção dos processos algícos, liberando substâncias produzidas por neurônios (Clark, Malcangio, 2014; Milligan et al., 2005).

No estudo feito por Milligan et al. (2004), usando o modelo de CCI em ratos, os autores utilizaram uma injeção de antagonista de fractalcina e observaram uma diminuição da alodinia mecânica e hiperalgesia quando comparado aos animais que não receberam a injeção. Os autores sugerem que a liberação de FKN pode contribuir para a manutenção da dor neuropática (Milligan et al., 2004).

É sabido na literatura que o LASER principalmente o de baixa intensidade tem efeito anti-inflamatório. Neste sentido Yamato et al. (2012), utilizaram o LASER de baixa intensidade em ratos com glomerulonefrite induzida por meio de injeções intravenosas de anticorpos, os animais foram submetidos a 14 sessões de laserterapia, após o tratamento os animais foram sacrificados, onde foi observado por meio de análises histológicas que o LBI diminui os níveis de IL-1 e TNF- α (Yamato et al., 2012).

1.6 LASER 904nm como potencial terapêutico na dor neuropática

Na fisioterapia é comum o uso de recursos físicos como, por exemplo, o LASER no tratamento de pacientes visando uma rápida recuperação e consequente restabelecimento das atividades de vida diária.

O LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* – amplificação da luz por emissão de radiação estimulada) se diferencia por ter em sua característica a monocromaticidade (único sentido de ondas), a coerência (sincronismo em que as ondas seguem o mesmo tempo e espaço) e a colimação que são ondas paralelas e unidirecionais, diferenciando-se de outras formas de emissão de luz como, por exemplo, a luz incandescente (comum) que se perde no tempo e espaço, uma vez que esse tipo de luz é incoerente, tanto a luz do LASER quanto a de uma lâmpada comum, é emitida quando um átomo é elevado a um nível de excitação e perde energia, porém a luz comum diferentemente do LASER, possui uma grande variabilidade de comprimento de ondas, o que faz com que ela se perca no tempo e espaço. Outra diferença entre as duas fontes de luz é a quantidade de número de fótons por unidade de área de emissão, que no LASER é muito maior do que em qualquer outra fonte de luz (Karu, 1999; Moura, 2009).

O LASER é emitido a partir de uma caixa composta por espelhos, denominado de (caneta), local em que os átomos são elevados a um estado de excitação ao ser acionado pela eletricidade (Rosa, 2009). Após o estímulo os elétrons que se encontram em seu estado fundamental, ao redor dos átomos, são elevados a uma excitação devido ao ganho de energia, e ao retornarem para o estado de equilíbrio ou perda de energia emitem fótons. O fóton se propaga pelo condutor, ou seja, a “caneta” na forma de um feixe de luz que irá interagir com diferentes tecidos biológicos (Moura, 2009). A energia fornecida pelo LASER obtém grande quantidade de fótons, que ao atingirem com os tecidos biológicos são absorvidos pelas camadas da pele, para que seu efeito terapêutico seja utilizado pelo corpo humano, e para que isso ocorra, é necessário que haja absorção para se obter uma interação com moléculas e células (Moura, 2009).

Os mecanismos da interação do LASER com os tecidos biológicos ainda não são bem elucidados e descritos, sendo que, um dos mecanismos citados na literatura é a ação da radiação sob moléculas fotossensíveis denominadas cromóforos (Karu, 1999). Segundo Sato (2006) os cromóforos absorvem o LASER e interagem com moléculas como os citocromos e o citocromo oxidase, que possuem grupos proteicos e ligações químicas capazes de se oxidar, fato que, resulta

na ativação da cadeia respiratória das mitocôndrias facilitando assim o influxo de íons de Ca^{2+} e com isso resultando na ativação celular propiciando cicatrização de feridas, analgesia entre outros (Pinto et al., 2010). As células eucariotas possuem o citocromo oxidase (proteína de membrana), que é uma enzima terminal da cadeia respiratória, está proteína absorve a luz do LASER sendo que, a cadeia respiratória é o início para os efeitos da radiação infravermelha (Sato, 2006).

Figura 1- Nas célula eucariótica as mitocôndrias são consideradas os geradores de energia da, onde ocorre a 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. Em tecido que contém a mitocôndria e é exposto à radiação de baixo nível um efeito semelhante é produzido. Ocorre uma regulação positiva da respiração celular quando a luz visível próximo do infra-vermelho e absorvida pela organela (Hashmi et al., 2010b). Adaptado de Hashmi J.T. et al. (2010). FONTE: (Hashmi et al., 2010b).

Nos últimos anos as pesquisas realizadas com LASER principalmente o de baixa intensidade (LBI), vem apresentando resultados satisfatórios como acelerador da cicatrização de feridas, poder de analgesia em diversos sintomas dolorosos, por liberação de β -endorfina (Ferreira, 2006; Hashmi et al., 2010a; Pinto et al., 2010; Yan et al., 2011). Neste sentido a

revisão sistemática realizada por Bjordal et al. (2003) identificou 88 ensaios clínicos randomizados controlados sobre a aplicação do LBI no combate à dor crônica, sendo 11 artigos com alta qualidade metodológica avaliados utilizando a escala *Physiotherapy Evidence Database* (PEDro). Neste estudo, os autores demonstraram que esta modalidade terapêutica (laserterapia) reduz significativamente a dor (Bjordal et al., 2003). No estudo prospectivo, randomizado e duplo cego realizado por Soriano e Rios (1999) que consistia em dois grupos, (irradiado com LBI e falso irradiado com LBI) utilizando o comprimento de onda de 904nm para combater a dor crônica da região lombar de pacientes com mais de 60 anos de idade, identificaram utilizando a escala analógica visual de dor que esta modalidade terapêutica reduz significativamente a dor dos pacientes (Rios, 1999).

Tam (1999), investigou o potencial analgésico também do LASER 904nm no período de maio de 1987 a janeiro de 1997, em 372 pacientes com idade média de 45 anos apresentando doenças reumáticas e degenerativas, patologias traumáticas e úlceras cutâneas. Neste estudo, o autor concluiu que o LASER 904nm foi capaz de melhorar a dor de forma substancial, reduzindo os sintomas bem como melhorou a qualidade de vida dos diversos pacientes retardando inclusive procedimentos cirúrgicos (Tam, 1999). Sendo a dor neuropática de difícil tratamento e podendo levar o paciente a uma condição de isolamento psicossocial, muitos pesquisadores têm tentado desenvolver terapias para se obter sucesso no tratamento desse tipo de patologia, nos últimos anos os pesquisadores vêm utilizando o LBI por ser uma técnica não invasiva e de baixo custo que tem se mostrado eficaz no controle das mais diversas dores crônicas (Tam, 1999). A laserterapia vem sendo utilizada em toda área da saúde por ser um método não invasivo e eficaz na diminuição das mais diversas dores, um estudo feito em pacientes que foram submetidos á cirurgias ortognática e posteriormente tratados com LBI apresentaram melhora na dor onde foi constatado por meio da escala visual analógica e consequente diminuição do edema (Gasperini et al., 2014).

Masoumipoor et al. (2014), em seu estudo utilizando um modelo de dor neuropática crônica (CCI) em ratos, submeteram os animais a sessões de laserterapia em duas modalidades de ondas sendo elas 680 e 980nm durante duas semanas, os autores concluíram que a técnica é eficaz na redução da dor neuropática porém, os autores observaram por meio de testes comportamentais uma melhora significativa nos animais irradiados com o comprimento de ondas

de 680nm do que nos que foram irradiados com os com o comprimento de ondas de 980nm (Masoumipoor et al., 2014).

Ainda, há relatos na literatura do efeito positivo do LASER na regeneração de nervos periféricos, bem como na melhora da locomoção. No estudo feito por Medalha et al. (2012), em ratos com ressecção completa do nervo isquiático e irradiados com LBI 24 horas após a lesão, os animais foram submetidos á quinze sessões de laserterapia, observou-se melhora na locomoção por meio do teste do índice funcional do isquiático (IFC) o que constata que o LASER também age regeneração periférica (Medalha et al., 2012).

Assim, acreditamos que os efeitos do LASER 904nm possam estar associados a alterações celulares no gânglio da raiz posterior do nervo espinal (DRG), bem como a migração de células que participam do processo inflamatório, uma vez que nos últimos anos, nosso laboratório vem estudando que o aumento da imunorreatividade (IR) de fatores neurotróficos como, por exemplo, o fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), todos os fatores importantíssimos para o desencadeamento de neuropáticas periféricas (Martins et al., 2012; Oliveira et al., 2014)

1.7 Justificativa e hipótese

Alternativas terapêuticas para o tratamento da dor neuropática se fazem necessárias, uma vez que essa modalidade de dor não responde satisfatoriamente a nenhum tipo de intervenção convencional, ou seja, cirúrgica e medicamentosa. A fisioterapia tem demonstrado por meio da técnica de laserterapia ser eficiente para melhora da qualidade de vida de paciente com diferentes tipos de dor. Esta proposta está conectada a uma série de investigações realizadas em nosso grupo de pesquisa ao longo dos últimos anos, com o objetivo geral de entender os aspectos da fisiopatologia da dor neuropática além de buscar terapias alternativas para o tratamento desse tipo de dor.

O presente estudo torna-se importante devido à escassez de estudos demonstrando os efeitos da técnica de laserterapia, uma vez que esta técnica é capaz de induzir analgesia na dor crônica que é clinicamente relevante e de difícil tratamento. Neste sentido, acreditamos que entendendo melhor os mecanismos envolvidos durante os processos de dor e analgesia, dentre eles o envolvimento dos receptores opóides endógenos (MOR ou (μ), DOR ou (δ) e KOR ou (k)),

a participação das citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-6, IL-10 e TNF alfa) e a possível participação da substância P poderão fornecer dados para o aperfeiçoamento da técnica de laserterapia. Assim, acreditamos que podemos contribuir de forma efetiva para os tratamentos clínicos empregados neste tipo de dor decorrente de lesões como, por exemplo, pinçamento de nervos, síndrome do túnel do carpo entre outras síndromes compressivas de difícil tratamento na clínica.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da Técnica de laserterapia sobre as alterações moleculares e comportamentais decorrentes da dor neuropática em ratos *Wistar*.

1.8.2 Objetivos específicos

- ✓ Induzir a dor neuropática em ratos *Wistar* e utilizar como procedimento terapêutico a técnica de laserterapia já adaptada e padronizada pelo Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor;
- ✓ Avaliar o comportamento do animal por meio dos modelos de hiperalgesia mecânica, alodinia mecânica e hiperalgesia térmica frente à dor neuropática e tratamentos;
- ✓ Avaliação da interferência do Isoflurano sobre a nocicepção induzida pela lesão constritiva crônica do nervo isquiático.
- ✓ Analisar a participação dos receptores opióides MOR (μ), DOR (δ) e KOR (k) no gânglio da raiz posterior através de ensaios de *Western Blot*;
- ✓ Analisar a participação da substância P no gânglio da raiz posterior através de ensaios de *Western Blot*;
- ✓ Analisar a participação de citocinas pró e antiinflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α e fractalquina) no soro sanguíneo, através de ensaios imunoenzimático para dosagem de citocinas (ELISA);

A hipótese central, comum ao conjunto desta proposta, é a interação dos comportamentos animais para a hiperalgesia com as análises dos ensaios de *Western Blot*. Espera-se que esta série de investigações contribua para maior elucidação dos mecanismos envolvidos na gênese da dor neuropática, e melhor compreensão dos mecanismos de ação da técnica de laserterapia, uma vez que a mesma já foi padronizada pelo nosso grupo de pesquisa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos machos *Wistar*, pesando entre 200-220 g (dois meses). Todos os animais foram adquiridos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Posteriormente, os animais foram encaminhados e mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada localizada no Biotério do departamento de Anatomia da Universidade de São Paulo, com isolamento acústico, temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ciclo claro/escuro (12:12 h). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA- n^o. 010 fls.02 do livro 03) do ICB. Para a realização dos experimentos comportamentais para hiperalgesia mecânica, térmica e alodílica foi utilizada a sala de comportamento do biotério do departamento de Anatomia, a qual possui isolamento acústico e temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$), local em que os animais foram mantidos por um período de 45 minutos para adaptação e posteriormente submetidos aos experimentos comportamentais. Todos os animais foram manipulados considerando os princípios e o guia de uso de animais de laboratório envolvendo dor e nocicepção (Zimmermann, 1983).

2.2 Indução da dor neuropática

Para indução de dor foi utilizado o método descrito por Bennett e Xie (1988). Os animais foram anestesiados e em seguida o nervo isquiático foi exposto na região intermédia da coxa, afastando-se o músculo bíceps femoral, músculo semitendíneo e músculo semimembranáceo. Próximo à trifurcação do nervo isquiático, 7mm de distância da trifurcação, foram realizadas 4 ligaduras frouxas ao redor do nervo com fio catgut cromado 4-0, distantes entre si em aproximadamente 1mm (figura 2). As ligaduras foram realizadas ao longo do nervo, até 4-5mm do ponto inicial. A incisão foi suturada em camadas, utilizando fio de sutura de seda número 4-0. O grupo controle foi composto por animais falso operados, submetidos à mesma incisão que os animais operados, com a exposição do nervo isquiático, porém sem a amarradura ao redor do nervo (Bennett, Xie, 1988).

Figura 2 - Ilustração do modelo de injúria por constrição crônica (CCI)

FONTE: Bennett e Xie (1988). (Cirurgia realizada no Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor)

2.3 Planejamento dos grupos experimentais

Utilizamos um total de 40 animais para *Western Blot* (N=8/grupo), que inclui do grupo um (1) ao cinco (5) conforme descrito abaixo. Os animais foram alocados conforme divisão de grupos abaixo. Todos os animais foram inicialmente submetidos aos testes comportamentais e de acordo com os tempos de tratamento os animais foram eutanasiados e a seguir, submetidos aos ensaios de *Western Blot*. Cabe mencionar que utilizamos os mesmos animais para retirar o sangue (soro) para os ensaios de ELISA.

- **Grupo 1: ratos controle (NAIVE):** animais sem nenhum tipo de lesão ou tratamento;
- **Grupo 2: (CCI+ LASER):** ratos com dor neuropática, tratados com laserterapia a partir do 14º dia após a cirurgia e eutanasiados após a 10ª sessão de laserterapia (20 dias após a CCI);
- **Grupo 3: (CCI):** ratos com dor neuropática (CCI - operado no mesmo dia do grupo 2), porém, **sem** tratamento com laserterapia, e eutanasiados após 20 dias pós-operatório;
- **Grupo 4: ratos controle (FOP+LASER):** ratos falso operados, tratados com laserterapia a partir do 14º dia após procedimento cirúrgico e eutanasiados após 20 dias pós-operatório;
- **Grupo 5: ratos controle (FOP):** ratos falso operados, porém **sem** tratamento com laserterapia e eutanasiados após 20 dias pós-operatório.

Adicionamos um grupo CCI Isoflurano para que pudéssemos excluir qualquer interferência do anestésico em nossos testes comportamentais, neste grupo utilizamos um adicional de 12 animais, 6 animal por grupo.

- **Grupo 6: CCI+ Isoflurano:** Ratos operados sem laserterapia e submetidos ao anestésico inalatório.

- **GRUPO 7: CCI+LASER com pausa:** Ratos operados submetidos a laserterapia, com pausa do tratamento para avaliação temporal do efeito da sessão de LASER.

2.4 Avaliação da sensibilidade dolorosa

Para a realização dos testes comportamentais todos os ratos foram inicialmente habituados por quarenta e cinco minutos, durante dois dias que antecedem os experimentos. No dia do ensaio, os animais foram colocados nos locais de testes 20 minutos antes do início dos experimentos. Todos os resultados dos testes comportamentais foram avaliados por meio de comparações das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais e controles.

2.4.1 Determinação da hiperalgesia mecânica

Para a avaliação da sensibilidade dolorosa dos animais utilizamos o teste de pressão da pata de ratos (Analgesy-Meter Ugo Basile®, Itália), realizado de acordo com o método descrito por Randall e Sellito (1957). Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16 g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso da pata posteriores operada do rato e interrompida quando o animal apresenta a reação de "retirada" do membro (figura 3). Neste modelo, o limiar de dor é representado como a força (g) necessária para a indução da reação (Randall, Selitto, 1957). Este teste foi aplicado no grupo crônico da seguinte forma: Antes do início dos tratamentos (MI - medida inicial) e em diversos tempos após a indução da hiperalgesia (14d, 2º sessão, 4º sessão, 6º sessão, 8º sessão e 10º sessão-MF - medida final).

Os resultados foram analisados por meio da comparação das médias dos grupos experimentais CCI e CCI LASER com grupos controles (FOP, FOP+ LASER e NAIVE).

Figura 3 - Ilustração do teste de pressão de pata

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

2.4.2 Determinação da alodinia mecânica

A determinação da alodinia mecânica foi avaliada por ensaio quantitativo, em resposta a estímulo tátil aplicado à pata posterior operada do rato, segundo método descrito por Chaplan em 1994, modificado. O filamento capaz de induzir a retirada da pata, duas vezes consecutivas, foi considerado como a força em gramas necessária para induzir a resposta (100% de resposta) (Chaplan et al., 1994). 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 base de arame, que mede 1 metro de comprimento por 45 cm de largura, com espaço entre os arames de 1 cm. A base de arame fica fixada na parede a dois metros do chão, para permitir acesso às patas destes animais. Os ratos foram inicialmente habituados à gaiola, por quarenta e cinco minutos, durante dois dias que antecederam os experimentos. No dia do ensaio, os animais foram colocados na gaiola, 15 minutos antes do início dos experimentos. Para o ensaio de alodinia, foi empregada uma série logarítmica de 10 filamentos de Von Frey (figura 4) (Aesthesiometer Semmes-Weinstein, Stoelting Co., EUA). Os filamentos e seus valores respectivos em gramas são: 3.61 (0.407 g.); 3.84 (0.692 g.); 4.08 (1.202 g.); 4.17 (1.479 g.); 4.31 (2.041 g.); 4.56 (3.630 g.); 4.74 (5.495 g.); 4.93 (8.511 g.); 5.07(11.749 g) e 5.18 (15.136 g.). O filamento capaz de induzir a retirada da pata, duas vezes consecutivas, foi considerado como a força em gramas necessária para induzir a resposta (100% de resposta) (Chaplan et al., 1994).

No grupo crônico este teste foi aplicado antes do procedimento cirúrgico para obtenção da (medida inicial), após 14 dias da lesão, para avaliar se o procedimento cirúrgico (CCI) induziu a hiperalgesia e ao longo do tratamento com laserterapia, com a finalidade de avaliar se este tratamento melhora da resposta nociceptiva.

Os resultados foram avaliados por meio de comparação das médias das medidas iniciais. Os resultados foram analisados através da comparação das médias dos grupos experimentais com grupos controles (FOP, FOP+LASER e NAIVE).

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).

2.4.3 Determinação da hiperalgesia térmica

A determinação da hiperalgesia térmica foi feita por meio do teste plantar descrito por (Hargreaves et al., 1988). O teste consiste em aquecimento por meio de fonte de luz infravermelha aplicada na região plantar da pata posterior operada do rato, até que o animal apresente o comportamento de retirada da pata ou o aquecimento da pata atinja o limite de tempo predeterminado (tempo de corte de 30,1 segundos – para que não “queime” a pata do animal caso este não a retire).

Os animais foram colocados em compartimentos de acrílico individual com tampa com pequenos orifícios para ventilação e posicionados sobre uma plataforma de vidro especial que permite a passagem de forma homogênea da luz e do calor. Uma fonte de luz infravermelha está acoplada a um monitor digital.

A fonte de luz é colocada embaixo do vidro, sendo posicionada e acionada sob a pata traseira do animal (figura 5). Quando a fonte de luz é posicionada e acionada pelo pesquisador, um cronômetro digital é deflagrado no monitor que fica acoplado a fonte luminosa até que o animal retire a pata, quando então, a fonte de luz cessa e o cronômetro para automaticamente. Caso o animal não apresente o comportamento de retirada da pata em 30 segundos, automaticamente a fonte de luz é cortada para a preservação da integridade física do animal. No grupo crônico este teste foi aplicado antes do procedimento cirúrgico para obtenção da (medida inicial) e após diversos tempos após lesão e tratamento com laserterapia.

Os resultados foram avaliados por meio de comparação das médias das medidas iniciais. Os resultados foram analisados através da comparação das médias dos grupos experimentais (CCI e CCI+LASER) com grupos controles (FOP, FOP+LASER e NAIVE).

Figura 5 - Ilustração do teste de hiperalgesia térmica - Hargreaves

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

2.5 Procedimento terapêutico – Técnica Laserterapia

Para tratar os ratos que foram submetidos ao modelo de dor neuropática, utilizamos como modalidade terapêutica a técnica de laserterapia e adaptada em nosso laboratório- Neuroanatomia funcional da dor (figura 6), conforme artigo publicado (Martins et al., 2012).

Figura 6 - Ilustração do tratamento com a técnica de laserterapia adaptada no Laboratório de Neuroanatomia Funcional da dor.

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

Inicialmente os ratos foram anestesiados com Isoflurano (anestésico inalatório - Cristália LTDA) com fluxo contínuo de oxigênio (5 L/ min) na posição de decúbito lateral esquerdo (painel A). Após a anestesia, iniciamos o tratamento dos animais, posicionamos a caneta na região da injúria para realização da técnica (Painel B). No Painel C e D podemos observar o aparelho Laser Pulse Ibramed, utilizado para o procedimento da técnica de laserterapia ilustrando dosimetria (descrita na tabela abaixo-Tabela 1). A primeira sessão de laserterapia foi iniciada no 14º dia após indução da lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI), a seguir, os animais foram tratados em dias intercalados, ou seja, dia sim, dia não, somando um total de 10 sessões de laserterapia (21 dias). No final do procedimento, os animais foram sacrificados e os tecidos coletados para análise.

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
Mode de operação	Pulsado
Frequência [Hz]	9500 Hz
Duração do pulso [sec]	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 [sec]	18s
Exposição radiante [J/cm ²]	6J/cm ²
Energia radiante [J]	6J
Potência de saída	70Wpk
Número de pontos irradiados	9
Área irradiada [cm ²]	0.9 cm ²
Técnica de aplicação	Em contato com a pele
Número e frequência de sessões do tratamento	10 sessões, realizadas a cada dois dias
Energia radiante total [J]	30J por sessão, 300J ao total das sessões

Tabela 1 - Tabela 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(de Oliveira Martins et al., 2013; Jenkins, Carroll, 2011).

2.6 Ensaios de *Western Blot*

Cabe mencionar que inicialmente, os animais foram avaliados nos testes comportamentais, posteriormente, submetidos aos procedimentos cirúrgicos e/ou terapêuticos, sendo sacrificados (utilizando guilhotina), após todos os procedimentos para a retirada dos tecidos. Os gânglios das raízes de L4-L6 (lado ipsilateral) dos animais experimentais (CCI e CCI+LASER) e controle (FOP, FOP+LASER e NAIVE) foram retirados para análise. O conteúdo proteico do material isolado dos animais foi dosado pelo método de Bradford (Amresco, U.S.A) (Bradford, 1976). Após a dosagem os tecidos foram submetidos 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 cinco minutos. O material foi aplicado num gel de poliacrilamida a 12% e submetido à eletroforese com corrente constante de 25 mA (Laemmli, 1970). Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, 0,2um de diâmetro) de acordo com a técnica descrita por 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), Anti-MOR ou (μ), Anti-DOR ou (δ) e Anti-KOR ou (k) (todos 1:250 - Abcam), Substância P (1:1000 – Millipore Corporation) (Chuhma et al., 2011; Kabli, Cahill, 2007). Em seguida, as membranas foram lavadas com solução basal e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário marcado com peroxidase de raiz forte (goat anti rabbit HRP IgG (1:5.000; Chemicon). O controle endógeno foi marcado com β -actina (1:10000, Sigma), e ao término as membranas foram lavadas novamente com solução basal. Após a lavagem as membranas foram reveladas utilizando o Kit ECL (Amershan Biosciences, NJ/EUA) de quimioluminescência e analisadas quanto à densidade óptica das bandas marcadas, utilizando o programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD/EUA), e corrigido pela densidade óptica para a β -actina, considerando as amostras dos animais controle como o padrão para a normalização dos resultados.

2.7 Ensaios imunoenzimático para a dosagem de citocinas

Após ensaios comportamentais, foi colhido o sangue de cada animal, de todos os grupos descritos anteriormente e analisados para cada citocina específica. O sangue foi armazenado após eutanásia e centrifugado por 20 minutos a 3000 rpm. Para a dosagem de citocinas Fractalcina, IL-1 β , IL-6 e IL-10 e TNF- α foram utilizados reagentes específicos contidos no kit Milliplex®TM Map (Millipore Corporation, Darmstadt- Germany), conforme o protocolo especificado pelo fabricante. Foram adicionados 200 μ L de solução tampão por poço (placa de 96 poços) e a placa foi fechada e homogeneizada por dez minutos à temperatura ambiente. Foi retirado o sobrenadante e adicionado 25 μ L da solução padrão/poço, previamente preparado, e em seguida, adicionado os controles, as amostras e as beads. A incubação teve um total de tempo de 1 hora à temperatura ambiente (TA) e em seguida foi realizada a incubação overnight à

temperatura de 4 °C, sob agitação constante. Após a incubação overnight a placa foi deixada por mais uma hora sob agitação constante a TA. Em seguida, o conteúdo foi despejado e a placa lavada com tampão Wash buffer, 200 µL em cada poço, por 3 vezes. Após a lavagem foram adicionados 25 µL dos anticorpos de detecção na placa que foi mantida sob agitação constante em TA. Posteriormente foram adicionados 25 µL do complexo estreptavidina-ficoeritrina por poço e a placa permaneceu em agitação por 30 minutos em TA. Após o tempo determinado de incubação a placa foi lavada novamente por 3 vezes com solução tampão Wash buffer. Após as lavagens foi adicionada uma solução de parada (Sheat Fluid), 125 µL por poço. Por fim, levou-se a placa para a leitura no aparelho Bioplex-200 System (Bio-Rad). A concentração mínima detectada (CMD) é calculada pelo aparelho em pg /mL e dada curva padrão é comparadas com cada amostra para as diferentes citocinas.

2.8 Análise estatística

Os dados foram representados como média $\pm$ E.P.M. A análise estatística foi gerada utilizando o programa GraphPad Prism versão 5 (utilizando-se 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 será considerado de $p \leq 0,05$ (Sokal, Rohlf, 1981).

3 RESULTADOS

3.1 Efeito da técnica de laserterapia sobre a nocicepção induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI)

3.1.1 Efeito na hiperalgesia mecânica

Os animais inicialmente sem sofrer nenhum procedimento cirúrgico, foram submetidos ao teste comportamental para avaliação da resposta hiperalгésica (MI). No 14º dia (14d) após a lesão todos os animais foram re-avaliados para verificação de possíveis alterações do limiar nociceptivo. Observou-se uma diminuição do limiar nociceptivo do grupo experimental (CCI) quando comparado com a MI e com os grupos controles (FOP, FOP+LASER e NAIVE). Esta diminuição se manteve no decorrer de todas as medidas comportamentais até a data da eutanásia. Os animais foram submetidos á 10 sessões de laserterapia (CCI+LASER), e após a 2ª sessão observamos um aumento do limiar nociceptivo chegando a níveis basais. Com relação aos grupos controles, (FOP, FOP+LASER e o NAIVE), não foi possível observar diferenças significativas entre eles (figura 7).

Figura 7 - Efeito da técnica de laserterapia sob a resposta nociceptiva nos ratos com lesão no nervo isquiático.

O limiar de dor determinado pelo teste de Randall & Selitto e expresso em gramas foi avaliado antes do procedimento cirúrgico (MI), 14 dias (14d) após lesão e diversos tempos após o tratamento com LASER. Os resultados apresentam a média de $\pm$ EPM de 20 animais por grupo. * $p < 0,001$ em comparação com a MI; *** $p < 0,001$ em comparação entre o grupo CCI+LASER e o grupo CCI.

3.1.2 Efeito na alodinia mecânica

Após a lesão constritiva crônica (CCI) do nervo isquiático observamos uma diminuição do limiar de alodinia, quando comparado à medida inicial e aos grupos controles (FOP, FOP+LASER e NAIVE). A intensidade do estímulo (em gramas) é identificada a partir de uma série logarítmica de filamentos, como descrita por Von Frey. Identificamos uma reversão do limiar nociceptivo nos animais tratados com LASER a partir da 2ª sessão, a qual se manteve até a décima sessão. Animais falso-operados não apresentaram diferença em relação à medida inicial (figura 8).

Figura 8 - Efeito da técnica de laserterapia após lesão (CCI) sobre o limiar tátil em ratos.

O limiar de alodinia, avaliado pelo teste de Von Frey e expresso em gramas foi determinado antes (MI), 14 dias e em diversos tempos após a lesão. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 20 animais por grupo. * $p < 0,001$ em comparação com a MI; *** $p < 0,001$ em comparação entre o grupo CCI+LASER e o grupo CCI.

3.1.3 Efeito na hiperalgesia térmica

Os animais foram submetidos à constrição no nervo isquiático (CCI), Identificamos que a lesão acarretou numa diminuição do limiar térmico quando comparado à medida inicial e aos grupos controles (FOP, FOP+LASER e NAIVE). Identificamos também um aumento no limiar nociceptivo dos animais tratados com LASER a partir da 2ª sessão a qual se manteve até a décima sessão. Os animais controles não apresentaram diferença em relação à medida inicial (figura 9).

Figura 9 - Efeito da técnica de laserterapia sob a resposta nociceptiva (estimulação térmica) nos ratos com lesão no nervo isquiático.

O limiar térmico avaliado pelo teste de Hargreaves expresso em segundos foi avaliado antes do procedimento cirúrgico (MI), 14 dias (14d) e diversos tempos após o tratamento com Laser. Os resultados apresentam a média de $\pm$ EPM de 20 animais por grupo. * $p < 0,001$ em comparação com a MI; *** $p < 0,001$ em comparação entre o grupo CCI+LASER e o grupo CCI.

3.2 Efeito do anestésico inalatório sobre a nocicepção induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI)

A constrição do nervo isquiático (CCI) ocasionou na diminuição do limiar térmico (Figura 10A), mecânico (Figura 10B) e do limiar alodínico (Figura 10C) quando comparado à medida inicial (MI). Observamos que os grupos CCI Isoflurano apresentam valores semelhantes ao grupo CCI Isoflurano, indicando que o anestésico inalatório não é capaz de interferir na resposta comportamental.

Figura 10 - Efeito do anestésico inalatório sob a resposta nociceptiva nos animais submetidos a CCI.

O limiar térmico (A), mecânico (B) e limiar alodínico (C) foi avaliado antes de qualquer procedimento (MI), 14 dias (14d) após lesão e antes das sessões com anestésico inalatório (Isoflurano). Os resultados apresentam médias de $\pm$ EPM de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com os demais grupos.

3.3 Efeito da duração da laserterapia sobre a nocicepção induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI) após pausa no tratamento

Como descrito anteriormente, a CCI é capaz de induzir diminuição do limiar nociceptivo (térmico, mecânico e alodínico). Cabe mencionar que, a laserterapia é capaz de melhorar o quadro algico como observado nos animais com CCI. As figuras: (11 A) limiar térmico, (figura 11 B) mecânico e (figura 11C) alodínico, têm como finalidade demonstrar o tempo após a pausa de sessão de LASER. Para tanto, ao finalizarmos a quarta sessão de LASER (4^as), podemos observar uma melhora comportamental em todos os testes analisados, esta melhora nociceptiva se manteve até o quinto dia (5d) após a quarta sessão, retornando o quadro algico no sexto dia (6d). Duas novas sessões foram realizadas (5^a e 6^a s) a fim de tentar manter o nível algico baixo. No entanto, apenas após a última sessão (6^as), foi possível reverter o quadro algico aos níveis basais se igualando ao animal NAIVE que é nosso controle.

Figura 11 - Efeito da duração do LASER após pausa no tratamento sobre a resposta nociceptiva nos animais submetidos a CCI.

O limiar térmico (A), mecânico (B) e limiar alodínico (C) foi avaliado antes de qualquer procedimento (MI), 14 dias (14d) após lesão, antes e depois das sessões de LASER e todos os dias após a pausa do tratamento. Os resultados apresentam médias de $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,001$ em comparação entre o grupo CCI+LASER e o grupo CCI. # $p < 0,01$ em comparação com o grupo CCI+LASER e o grupo CCI.

3.4 Efeito do LASER nos parâmetros celulares por meio dos ensaios de Western Blot

3.4.1 Substância P no gânglio da raiz posterior (DRG) segmento L4 - L6

Com relação à avaliação da substância P, observamos um aumento da densidade óptica das bandas marcadas para substância P no grupo CCI. Após o tratamento com LASER, observamos uma redução da expressão desta substância para níveis basais, não sendo possível identificar diferenças estatísticas com os grupos controles, (NAIVE, FOP) (figura 12).

Figura 12 - Efeito da Técnica de laserterapia na síntese da Substância P no gânglio da raiz posterior de ratos.

Quantificação da densidade óptica da Substância P no gânglio da raiz dorsal. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. *p < 0.05 em comparação aos demais grupos e #p < 0.05 em comparação entre o grupo CCI+LASER e CCI.

3.4.2 Análise dos receptores opióides MOR, DOR E KOR no gânglio da raiz posterior (DRG) segmento L4 – L6

Com o objetivo de entender melhor o mecanismo de analgesia identificada nos testes comportamentais, avaliamos o envolvimento dos receptores opióides no nosso modelo experimental, utilizamos três diferentes receptores opióides: MOR (Figura 13A), DOR (Figura 13B) e KOR (Figura 13C). Não foi observada diferença estatística entre os grupos analisados em nenhum dos três tipos de receptores opióides analisados.

Figura 13 - Efeito da técnica de laserterapia sobre os receptores opióides MOR, DOR e KOR, no gânglio da raiz posterior de ratos com CCI.

Quantificação da densidade óptica para os receptores opióides MOR, DOR e KOR no gânglio da raiz posterior. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo.

3.5 Efeito do LASER sobre a liberação de citocinas pró e anti-inflamatória no soro sanguíneo por meio da técnica de ELISA

3.5.1 Análise da Interleucina 1 β

Com relação à avaliação da liberação da interleucina 1 β observamos um aumento desta interleucina no grupo CCI (lesionado) e uma diminuição no grupo que recebeu tratamento com o LASER (CCI+LASER). Esta diminuição observada após tratamento chegou próximo os níveis dos grupos controles, (NAIVE, FOP e FOP+LASER) (figura 14).

Figura 14 - Efeito da Técnica de laserterapia na modulação da liberação da Interleucina 1 β no soro sanguíneo.

Quantificação da interleucina 1 β por meio da técnica de ELISA no soro sanguíneo. Os resultados apresentam a média $\pm$ EPM de 4 animais por grupo. *p < 0.001 por comparação entre o grupo CCI e os demais grupos.

3.5.2 Análise da Fractalcina

Na análise da liberação da fractalcina nos animais submetidos à lesão constritiva crônica, observamos um aumento desta citocina no grupo CCI (lesionado) e uma diminuição após tratamento com LASER (CCI+LASER) (figura 15).

Figura 15 - Efeito do tratamento com LASER na modulação da liberação da Fractalcina no soro sanguíneo.

Quantificação da Fractalcina por meio da técnica de ELISA no soro sanguíneo. Os resultados apresentam a média $\pm$ EPM de 4 animais por grupo. * $p < 0.001$ por comparação entre o grupo CCI e os demais grupos.

3.5.3 Análise da Interleucina 10

Com relação aos ensaios para interleucina 10 não identificamos diferenças estatísticas em relação aos grupos analisados. No grupo tratado com LASER (CCI+LASER), observamos uma tendência ao aumento da IL-10, porém também não observamos diferenças estatísticas entre os grupos (figura 16).

Figura 16 - Efeito da Técnica de laserterapia na modulação da liberação da Interleucina 10 no soro sanguíneo.

Quantificação da interleucina 10 por meio da técnica de ELISA no soro sanguíneo. Os resultados não apresentam diferenças estatísticas entre os grupos. Os resultados apresentam a média $\pm$ EPM de 4 animais por grupo.

4 DISCUSSÃO

A transdução das informações nociceptivas ocorre por meio da ativação dos nociceptores presente em diversos tecidos. A dor por sua vez se dá por meio da ativação destes nociceptores, chamados de terminações nervosas livres, que também recebem o nome de receptores sensoriais, e são sensíveis a estímulos nocivos. Estes receptores são amplamente encontrados na pele e podem ser ativados por estímulos térmicos, mecânicos e químicos, quando ativados são capazes de conduzir os impulsos elétricos por meio de fibras amielínicas denominadas de fibra C e por fibras mielínicas aferentes A e β . A sensibilização se dá por meio da diminuição do limiar nociceptivo, ou por ativação após dano tecidual caracterizando a dor, que causa liberação de mediadores pró-nociceptivos, que terão ação sobre os nociceptores ativando-os ou exarcebando sua sensibilidade resultando em hiperalgesia mecânica, hiperalgesia térmica e alodínia mecânica (Dray, 1995; Dray, 1997).

Para o presente projeto escolhemos o modelo de dor neuropática periférica, por meio da lesão constritiva crônica do nervo isquiático (CCI), como forma de esclarecer melhor os fenômenos que ocorrem durante o processo da dor neuropática. Escolhemos gânglio da raiz posterior que está localizado na coluna vertebral e é o início dos nervos periféricos, neles estão localizados corpos de neurônios sensoriais que fazem a transmissão das informações periféricas ao sistema nervoso central (SNC). Neste sentido, quando ocorre algum tipo de lesão no nervo periférico, esses neurônios tem sua excitabilidade aumentada e conseqüentemente sua transmissão amplificada devido as diversas descargas ectópicas que são sendo geradas (Sapunar et al., 2012).

Assim, inicialmente, padronizamos o modelo de neuropatia periférica em ratos e com isso, induzimos a CCI como descrito por Bennett and Xie 1988. No 14^o dia (14d) pós lesão os animais apresentaram dor neuropática seguido de hiperalgesia e alodinia, o que nos permitiu a padronização do modelo nosso modelo, corroborando com a literatura (Bennett, Xie, 1988; Payne, Norfleet, 1986). As observações citadas acima, baseiam-se nos resultados obtidos em nosso projeto. Após análises comportamentais (hiperalgesia térmica, mecânica e alodínia mecânica) após a CCI, identificamos uma diminuição do limiar nociceptivo pós-lesão quando comparamos com as medidas iniciais (MI), o que demonstra que nosso modelo experimental foi padronizado com sucesso, corroborando com dados da literatura (Kukkar et al., 2012).

É sabido na literatura que o LASER causa efeito analgésico em humanos (Bjordal et al., 2003). Assim, com a finalidade de melhor compreender esse efeito induzido pelo LASER,

padronizamos a técnica de laserterapia para tratamento em animais com lesão neuropática, a fim de tentar auxiliá-lo no tratamento de pacientes na prática clínica.

Baseados nos dados citados anteriormente, diversos tipos de tratamentos vêm sendo estudados para otimizar as terapias para o controle da dor neuropática. Na maioria dos casos tem-se utilizado fármacos, porém, estes potentes analgésicos têm diversos efeitos colaterais como por exemplo, depressão do sistema ventilatório além de serem dose dependente (Thibault et al., 2014). Pensando nisso, cientistas estão em busca de diversas alternativas para o controle da dor neuropática (Masoumipour et al., 2014). Deer et al. (2013), em seu estudo, utilizaram eletrodos fixados de modo minimamente invasivo no espaço epidural lateral próximo ao DRG em pacientes que apresentavam dor crônica. Esses eletrodos foram acoplados a um estimulador elétrico, onde os pacientes foram submetidos de três a sete sessões de estimulação. Utilizando a escala visual analógica aplicada nos pacientes, os autores constataram uma diminuição significativa da dor (Deer et al., 2013).

Em nossos resultados identificamos a eficácia do LASER no combate à dor induzida pela CCI. Nossa observação está baseada em nossos resultados comportamentais, onde os animais submetidos à lesão do nervo isquiático e posteriormente tratados com LASER, apresentam uma melhora no limiar nociceptivo quando comparamos aos animais que não foram tratados. Esta melhora no comportamento animal, foi observada a partir da segunda sessão e se manteve até a décima sessão ou seja, vinte dias após o início do tratamento (Oliveira et al., 2014). Ainda, queríamos observar quantos dias após o cessamento do LASER podemos observar a melhora do comportamento. Para isso, submetemos os animais a quatro sessões de laser e observamos que após a quarta sessão, os animais foram capazes de manter o limiar alto, ou seja, iguais aos controles, por cinco dias. Após o quinto dia, os animais começaram a apresentar uma leve diminuição do limiar nociceptivo indicando o retorno da hipernocicepção, fato que se concretiza no sexto dia após a pausa no tratamento. Cabe mencionar que, ao submetemos esses animais novamente às sessões de LASER, observamos uma reversão total da hipernocicepção após duas novas sessões de laserterapia, quando comparamos aos animais NAIVE, indicando assim, mais uma vez, a eficácia do LASER para o tratamento da dor neuropática.

Neste sentido, com o sucesso na adaptação e padronização da técnica de laserterapia para pesquisa básica, nós passamos a estudar as alterações a nível molecular, envolvidas no tratamento com LASER de baixa intensidade em ratos com CCI.

Para tal, submetemos os gânglios das raízes posteriores de ratos a técnica de *Western Blot*, para análise da síntese de substância P (SP), que é um importante mediador nociceptivo na manutenção da dor neuropática. A SP é um neuropeptídeo sintetizado por neurônios do sistema nervoso (SN) sendo que, os neurônios não mielinizados presentes no DRG, apresentam uma imunorreatividade de 50% os quais interagem a receptores específicos (NK1) que são acoplados a proteína G. Estudos demonstram o envolvimento desse receptor frente a um quadro de dor neuropática, sugerindo que a SP está envolvida no quadro hiperalgésico sendo que após o bloqueio desse receptor o quadro algico é revertido (Bie, Zhao, 2011; Cahill,Coderre, 2002; Chen et al., 2014; Hokfelt, 1991; Jang et al., 2004; Lee, Kim, 2007).

Ainda, no estudo feito por Chen et al. (2014), utilizando um modelo de dor crônica muscular, os autores observaram um aumento da síntese de SP a nível espinal nos animais submetidos a cirurgia sem nenhum tratamento, quando comparado com os animais que foram submetidos a estimulação elétrica nervosa transcutânea. Os autores concluíram que além de atenuar a liberação desta substância o tratamento também diminuiu a alodínia pós cirurgica (Chen et al., 2014b). Esses achados na literatura corroboram com nossos resultados, uma vez que submetemos os DRG's ao processamento da técnica de *Western Blot* e observamos um aumento na síntese de substância P nos animais submetidos a CCI e uma diminuição após lesoterapia.

Chen et al. (2014), submeteram ratos a uma incisão muscular com posterior treinamento em esteira, e avaliaram o comportamento doloroso desses animais com filamentos de von frey. Por meio de ensaios imuno-histoquímicos foi avaliado no DRG, os níveis de substância P, interleucina 1 β e interleucina 6 que são importantes citocinas pró inflamatória. Segundo os autores, nos animais que não foram submetidos ao treinamento em esteiras houve uma diminuição do limiar nociceptivo, e um aumento dessas citocinas quando comparado aos animais submetidos ao treinamento na esteira (Chen et al., 2014a). Portanto, baseado em nosso estudo e nos mais diversos resultados encontrados na literatura, sabemos que após a ocorrência de um evento causador de lesão do nervo periférico, primeiramente irá ocorrer uma resposta inflamatória, além da inflamação da degeneração walleriana, com isso há uma ativação e migração de macrófagos e células de Schwann para o local lesionado e também para o DRG. Estes macrófagos ativados irão fazer com que a barreira hemato-encefálica seja interrompida por meio da ativação das metaloproteases (enzimas que digerem proteínas da matriz extracelular, que

tem várias funções, com por exemplo, reparação tecidual e remodelação em resposta à injúria). Com estes eventos, mediadores vasoativos são liberados no local da lesão como por exemplo, substância P, bradicinina entre outros. Ocasionalmente hiperemia e edema, promovendo a invasão de monócitos e linfócitos T. Os macrófagos e mastócitos liberam prostaglandinas e citocinas como por exemplo IL- 1 β , IL- 6, TNF α entre outros, e esses fatores podem induzir a sensibilização das fibras nociceptivas (Scholz, Woolf, 2007). Tendo em vista estas informações submetemos o soro sanguíneo dos animais conforme descrito no material e métodos, para a dosagem de citocinas pró e anti-inflamatória por meio da técnica de ELISA.

Observamos um nível elevado de IL- 1 β que é uma citocina pró inflamatória, nos animais submetidos a CCI, e uma diminuição no grupo tratado. Observamos também altos níveis de fractalcina nos animais submetidos a cirurgia, e reversão da liberação desta substância nos animais lesionados e submetidos a laserterapia. A fractalcina (FKN) é uma citocina que fica presa na parede da superfície extracelular dos neurônios, tendo seu receptor CXCR1 expresso em microglia. Estudos corroboram com nossos, demonstrando que estas células participam ativamente na ativação e manutenção dos processos dolorosos (Clark, Malcangio, 2014; Milligan et al., 2005). Ainda, estudos realizados por Yamato et al. (2012), utilizando a laserterapia em ratos com glomerulonefrite e posterior tratamento com LASER, demonstraram uma diminuição dos níveis de IL-1 e TNF- α nestes animais (Yamato et al., 2012), corroborando mais uma vez, com nossos resultados. Com relação à interleucina 10, nossos resultados mostram uma tendência ao aumento de IL- 10 nos animais operados submetidos ao tratamento com LASER, porém não observamos diferença estatística entre os grupos. Na literatura, a IL- 10 têm sido reportada como uma provável terapêutica para o combate da dor neuropática, apesar que não observamos a participação efetiva desta citocina, podemos sugerir, mais uma vez, que o LASER, diminui os níveis de citocinas pró inflamatória e aumentam os níveis de citocinas anti-inflamatória, e é eficaz para a manutenção do processo algico (Soderquist et al., 2010; Yamato et al., 2012).

Ainda, um dos nossos objetivos foi observar o envolvimento e/ou a participação de receptores opióides, uma vez que essas, são substâncias endógenas com ação no controle da dor. Esses receptores estão amplamente distribuídos em todo organismo, podendo ser também encontrados nos gânglios das raízes posteriores (DRG's), que são o alvo da nossa pesquisa, são potentes analgésicos e exercem efeitos farmacológicos e fisiológicos devido a interação com diversas substâncias (Sapunar et al., 2012).

A participação dos receptores opióides na analgesia, foi primeiramente evidenciada pela redução do quadro hiperalgésico, quando foi aplicado um agonista para os receptores MOR (μ), DOR (δ) e KOR (κ), o que foi sugerido a redução dos disparos em fibras do tipo c de neurônios primários (Mansour et al., 1994; Russell et al., 1987; Sánchez et al., 2010; Tegeder et al., 2003). Ainda, estudos recentes realizados por Zambelli et al. (2014), em modelo de inflamação periférica da pata de ratos, os autores evidenciaram o envolvimento de receptores MOR (μ) e KOR (κ), mas não Delta opioide, no DRG de ratos (Zambelli et al., 2014). Thibault et al. (2014) induziu a dor neuropática por vincristina em ratos, com posterior tratamento com oxicodona, um potente agonista para receptor opióide MOR e observaram aumento da ativação dos receptores gabaérgicos nos neurônios aferentes primários também do DRG de ratos, demonstrando assim o importante papel dos opióides em modelo de dores crônicas (Thibault et al., 2014).

Como mencionado, os receptores opióides desempenham um importante papel no organismo frente a mecanismos dolorosos. Portando esta informação, decidimos verificar a interação do LASER 904nm com os receptores opióides após a lesão constritiva crônica em ratos analisando o DRG destes animais. No entanto, ao submetemos os DRG's aos ensaios de *Western blot*, não foi possível observar diferença estatística em nenhum dos tres tipos de receptores opióides analisados, tanto para os animais experimentais quanto aos animais controle. A observação da inativação dos receptores opióides vai ao inverso dos nossos resultados comportamentais, uma vez que esses dados apresentaram melhora quanto ao quadro álgico dos animais. Em contrapartida a literatura nos mostra que ocorrem alterações na expressão dos genes frente ao estímulo causado pela dor neuropática, estas alterações ocorrem nas proteína encontradas em neurônios sensoriais, ocasionando mudanças em subunidades dos canais de sódio e cálcio e o envolvimento dos receptores opióides são afetados na transmissão dolorosa (Sapunar et al., 2012).

Chen et al. (2014), observaram que em ratos submetidos a CCI ocorre uma diminuição na liberação de receptor para opióide MOR (μ) na medula espinal, os autores também observaram uma inconsistente internalização do receptor NK1, com consequente aumento da liberação de substância P, o que propicia para a manutenção do quadro álgico na neuropatia periférica (Chen et al., 2014). Os resultados encontrados na literatura corrobora com nossos resultados, já que os nossos animais não apresentaram aumento de síntese proteica para os receptores opióides. Em contrapartida, nós também observamos que houve aumento da liberação de substância P, e de

citocinas pró inflamatórias, o que provavelmente proporcionou a diminuição do limiar nociceptivo dos animais com CCI. Ao submetemos os animais ao tratamento com LASER, houve reversão do limiar nociceptivo, com consequente diminuição de substância P e uma tendência ao aumento de IL- 10 que é uma interleucina anti-inflamatória.

Em síntese, o tratamento com LASER 904nm foi capaz de reverter o quadro algico induzido pela constrição no nervo isquiático, diminuiu a liberação de substância P e citocina pró inflamatórias, e ainda, observamos uma tendência ao aumento da interleucina 10. Confirmando então, a eficácia do LASER para o tratamento da dor neuropática em animais experimentais. Ainda, outros estudos realizados pelo nosso grupo, demonstraram que os animais submetidos a neuropatia do nervo alveolar inferior e, posteriormente tratados com LASER, tiveram uma melhora no quadro algico, e nos afirmando mais uma vez, a importância do laser como uma ferramenta terapêutica para o controle da dor neuropática (Martins et al., 2012).

5 CONCLUSÃO

Observamos que, o tratamento com LASER 904nm foi capaz de reverter o quadro álgico dos animais submetidos à lesão no nervo isquiático a partir da segunda sessão, e se mantendo até a décima sessão, ou seja, vinte dias após o início do tratamento. Ainda, observamos que após quatro sessões de LASER os animais mantiveram uma melhora no quadro álgico por mais cinco dias após cessar o tratamento.

Concluimos que, a resposta analgésica observada nos testes comportamentais se dá devido à diminuição da liberação de substância P, que é um importante mediador algogênico na manutenção da dor neuropática, e de citocinas pró- inflamatórias, e não por meio do aumento de síntese protéica dos receptores opióides como esperado no início da formulação desse projeto.

Ainda, os animais submetidos ao tratamento com LASER apresentaram uma tendência ao aumento da liberação de interleucina 10 que é uma citocina anti-inflamatória, e que na literatura tem sido reportada como um provável alvo terapêutico para o controle da dor neuropática, confirmando assim mais uma vez os efeitos benéficos do LASER.

REFERÊNCIAS*

- Aley KO, Levine JD. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. *Neuroscience*. 2002;111(2):389-97.
- Backonja MM. Defining neuropathic pain. *Anesth Analg*. 2003;97(3):785-90.
- Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annual Review of Neuroscience*. 1984;7(1):309-38.
- Basbaum AI, Gautron M, Jazat F, Mayes M, Guilbaud G. The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study. *Pain*. 1991;47(3):359-67.
- Bashiri H. Evaluation of low level laser therapy in reducing diabetic polyneuropathy related pain and sensorimotor disorders. *Acta Med Iran*. 2013;51(8):543-7.
- Beckmann KH, Meyer-Hamme G, Schroder S. Low level laser therapy for the treatment of diabetic foot ulcers: a critical survey. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;626127(10):16.
- 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.
- Bertolini GR, Artifon EL, Silva TS, Cunha DM, Vigo PR. Low-level laser therapy, at 830 nm, for pain reduction in experimental model of rats with sciatica. *Arq Neuropsiquiatr*. 2011;69(2B):356-9.
- Bie B, Zhao ZQ. Peripheral inflammation alters desensitization of substance P-evoked current in rat dorsal root ganglion neurons. *European Journal of Pharmacology*. 2011;670(2-3):495-9.
- Biro D. Is there such a thing as psychological pain? And why it matters. *Cult Med Psychiatry*. 2010;34(4):658-67.
- Bjordal JM, Couppé C, Chow RT, Turner J, Ljunggren EA. A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. *Australian Journal of Physiotherapy*. 2003;49(2):107-22.
- 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.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

-
- Cahill CM,Coderre TJ. Attenuation of hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain after intrathecal pre- or post-treatment with a neurokinin-1 antagonist. *Pain*. 2002;95(3):277-85.
- Campbell JN, Raja SN, Meyer RA, Mackinnon SE. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. *Pain*. 1988;32(1):89-94.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*. 1994;53:55-63.
- Chen W, McRoberts JA, Marvizon JC. μ -Opioid receptor inhibition of substance P release from primary afferents disappears in neuropathic pain but not inflammatory pain. *Neuroscience*. 2014; 267:67-82.
- Chen YW, Tzeng JI, Lin MF, Hung CH, Wang JJ. Forced treadmill running suppresses postincisional pain and inhibits upregulation of substance P and cytokines in rat dorsal root ganglion. *J Pain*. 2014a;15(8):827-34.
- Chen YW, Tzeng JI, Lin MF, Hung CH, Wang JJ. Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation Attenuates Postsurgical Allodynia and Suppresses Spinal Substance P and Proinflammatory Cytokine Release in Rats. *Phys Ther*. 2014b;11:11.
- Chuhma N, Tanaka KF, Hen R, Rayport S. Functional connectome of the striatal medium spiny neuron. *The Journal of neuroscience*. 2011;31(4):1183-92.
- Clark AK, Malcangio M. Fractalkine/CX3CR1 signaling during neuropathic pain. *Front Cell Neurosci*. 2014;8(121).
- Coggeshall RE, Zhou S, Carlton SM. Opioid receptors on peripheral sensory axons. *Brain research*. 1997;764(1-2):126-32.
- de Oliveira Martins D, Martinez dos Santos F, Evany de Oliveira M, de Britto LR, Benedito Dias Lemos J, Chacur M. Laser therapy and pain-related behavior after injury of the inferior alveolar nerve: possible involvement of neurotrophins. *J Neurotrauma*. 2013;30(6):480-6.
- Deer TR, Grigsby E, Weiner RL, Wilcosky B, Kramer JM. A prospective study of dorsal root ganglion stimulation for the relief of chronic pain. *Neuromodulation*. 2013;16(1):67-71.
- Devor M, Seltzer Z. Pathophysiology of damaged nerves in relation to chronic pain. In: Melzack PDWaR, editor. *Textbook of Pain*. Churchill Livingstone; 1999.p.129-64.
- Dray A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth*. 1995;75(2):125-31.
- Dray A. The pharmacology of pain. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer; 1997. p. 21-41.

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.

Ferreira MA. Efeitos do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização em ratos jovens e idosos: estudo morfométrico e morfológico. Altenas; 2006.

Fields HL, Heinricher MM, Mason P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annual review of neuroscience*. 1991;14(1):219-45.

Galer BS. Neuropathic pain of peripheral origin: advances in pharmacologic treatment. *Neurology*. 1995;45(12 Suppl 9):S17-25;discussion S35-6.

Gasperini G, Rodrigues de Siqueira IC, Rezende Costa L. Does low-level laser therapy decrease swelling and pain resulting from orthognathic surgery? *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014;25(14):00096-4.

Gebhart G. Descending modulation of pain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2004;27(8):729-37.

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 1988;32:77-88.

Hashmi JT, Huang YY, Osmani BZ, Sharma SK, Naeser MA, Hamblin MR. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. *PM R*. 2010a;2(12 Suppl 2):S292-305.

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*. 2010b;42(6):450-66.

Hokfelt T. Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron*. 1991;7(6):867-79.

Jang JH, Nam TS, Paik KS, Leem JW. Involvement of peripherally released substance P and calcitonin gene-related peptide in mediating mechanical hyperalgesia in a traumatic neuropathy model of the rat. *Neurosci Lett*. 2004;360(3):129-32.

Jenkins PA, Carroll JD. How to report low-level laser therapy (LLLT)/photomedicine dose and beam parameters in clinical and laboratory studies. *Photomed Laser Surg*. 2011;29(12):785-7.

Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001; 413(6852):203-10.

Kabli N, Cahill CM. Anti-allodynic effects of peripheral delta opioid receptors in neuropathic pain. *Pain*. 2007;127(1):84-93.

-
- 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.
- Kraychete DC, Sakata RK, Issy AM, Bacellar O, Jesus RS, Carvalho EM. Proinflammatory cytokines in patients with neuropathic pain treated with Tramadol. *Rev Bras Anesthesiol*. 2009; 59(3):297-303.
- Kukkar A, Singh N, Jaggi AS. Neuropathic pain-attenuating potential of aliskiren in chronic constriction injury model in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2012.
- Lee SE, Kim JH. Involvement of substance P and calcitonin gene-related peptide in development and maintenance of neuropathic pain from spinal nerve injury model of rat. *Neurosci Res*. 2007; 58(3):245-9.
- Lee SE, Kim JH. Involvement of substance P and calcitonin gene-related peptide in development and maintenance of neuropathic pain from spinal nerve injury model of rat. *Neuroscience research*. 2007;58(3):245-9.
- Lichtman AKAeAH. *Imunologia básica funções e distúrbios do sistema imonológico*; 2007.p. 354.
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, Watson SJ. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *The Journal of comparative neurology*. 1994;350(3):412-38.
- Martins DD, Santos FM, Oliveira ME, Britto LR, Lemos JB, Chacur M. Laser therapy and the pain-related behavior after injury of the inferior alveolar nerve: possible involvement of neurotrophins. *J Neurotrauma*. 2013.
- Masoumipoor M, Jameie SB, Janzadeh A, Nasirinezhad F, Soleimani M, Kerdary M. Effects of 660- and 980-nm low-level laser therapy on neuropathic pain relief following chronic constriction injury in rat sciatic nerve. *Lasers Med Sci*. 2014;16:16.
- Mayer DJ, Price DD. Central nervous system mechanisms of analgesia. *Pain*. 1976;2(4):379.
- Mayer DJ, Wolfle TL, Akil H, Carder B, Liebeskind JC. Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. *Science*. 1971;174(4016):1351.
- Medalha CC, Di Gangi GC, Barbosa CB, Fernandes M, Aguiar O, Faloppa F, Leite VM, Renno AC. Low-level laser therapy improves repair following complete resection of the sciatic nerve in rats. *Lasers Med Sci*. 2012;27(3):629-35.
- Milligan E, Zapata V, Schoeniger D, Chacur M, Green P, Poole S, Martin D, Maier SF, Watkins LR. An initial investigation of spinal mechanisms underlying pain enhancement induced by fractalkine, a neuronally released chemokine. *Eur J Neurosci*. 2005;22(11):2775-82.

Milligan ED, Zapata V, Chacur M, Schoeniger D, Biedenkapp J, O'Connor KA, Verge GM, Chapman G, Green P, Foster AC, Naeve GS, Maier SF, Watkins LR. Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. *Eur J Neurosci*. 2004;20(9):2294-302.

Moura KMBd. Efeito da Terapia de Baixa Potência na Reação Inflamatória e na Necrose Induzida pelo Veneno de *Bothrops asper* São Jose dos Campos: Universidade do Vale de Paraíba; 2009.

Oliveira ME, Santos FM, Martins DO, Bonifácio RP, Freitas MF, Chacur M. Low Power laser irradiation alters satellite glial cell expression and reverses behavioral test in rats with neuropathic pain. *Lasers in Medical Science*. 2014;Im press.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier; 2007.

Payne B, Norfleet MA. Chronic pain and the family: a review. *Pain*. 1986;26:1-22.

Pinto FC, Chavantes MC, Pinto NC, Alho EJ, Yoshimura EM, Matushita H, Krebs VL, Teixeira MJ. Novel treatment immediately after myelomeningocele repair applying low-level laser therapy in newborns: a pilot study. *Pediatr Neurosurg*. 2010;46(4):249-54.

Pinto M, Sousa M, Lima D, Tavares I. Participation of mu-opioid, GABA (B), and NK1 receptors of major pain control medullary areas in pathways targeting the rat spinal cord: Implications for descending modulation of nociceptive transmission. *The Journal of Comparative Neurology*. 2008;510(2):175-87.

Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesia activity on inflamed tissue. *Arch. Inst. Pharmacodyn*. 1957;111:209-19.

Rios FSeR. Gallium Arsenide LASER Treatment of Chronic Low Back Pain: A Prospective, Randomized and Double Blind Study
LASER Therapy. 1999;10:175:80.

Rosa SA. Efeitos da Radiação Laser de Baixa Potência com comprimentos de onda de 660nm e 904nm em um modelo experimental de osteoartrose [Mestrado]. Mato Grosso do Sul: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul;2009.

Russell N, Schaible HG, Schmidt R. Opiates inhibit the discharges of fine afferent units from inflamed knee joint of the cat. *Neuroscience letters*. 1987;76(1):107-12.

Sah DW, Ossipo MH, Porreca F. Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(6):460-72.

Sánchez EM, Bagües A, Martín MI. Contributions of peripheral and central opioid receptors to antinociception in rat muscle pain models. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2010; 96(4):488-95.

Sapunar D, Kostic S, Banozic A, Puljak L. Dorsal root ganglion - a potential new therapeutic target for neuropathic pain. *J Pain Res.* 2012;5:31-8.

Sato SK. Efeito do laser Arseneto de gálio (AsGa 904nm) na tolerância e limiar de dor avaliado através da algometria de pressão São Jose dos Campos: Vale do Paraiba; 2006.

Schaible HG. Peripheral and central mechanisms of pain generation. In: *Handbook of Experimental Pharmacology.* 2007. p.28.

Schmid AB, Nee RJ, Coppieters MW. Reappraising entrapment neuropathies--mechanisms, diagnosis and management. *Man Ther.* 2013;18(6):449-57.

Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci.* 2007;10(11):1361-8.

Soderquist RG, Milligan ED, Harrison JA, Chavez RA, Johnson KW, Watkins LR, Mahoney MJ. PEGylation of interleukin-10 for the mitigation of enhanced pain states. *J Biomed Mater Res A.* 2010;93(3):1169-79.

Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry.* New York; 1981. p. 859.

Stein C, Zöllner C. Opioids and sensory nerves. *Sensory Nerves.* 2009:495-518.

Tam G. Low power laser therapy and analgesic action. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery.* 1999;17(1):29-33.

Tegeder I, Meier S, Burian M, Schmidt H, Geisslinger G, Lötsch J. Peripheral opioid analgesia in experimental human pain models. *Brain.* 2003;126(5):1092.

Thibault K, Calvino B, Rivals I, Marchand F, Dubacq S, McMahon SB, Pezet S. Molecular mechanisms underlying the enhanced analgesic effect of oxycodone compared to morphine in chemotherapy-induced neuropathic pain. *PLoS One.* 2014;9(3).

Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology.* 2008;70(18):1630-5.

Vachon P, Millecamps M, Low L, Thompsons SJ, Pailleux F, Beaudry F, Bushnell CM, Stone LS. Alleviation of chronic neuropathic pain by environmental enrichment in mice well after the establishment of chronic pain. *Behav Brain Funct.* 2013;9(22):1744-9081.

Wall PD, Melzack R. *Textbook of pain.* New York.1999.

Wang LX, Wang ZJ. Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003; 55(8):949-65.

Waters AJ, Lumb BM. Descending control of spinal nociception from the periaqueductal grey distinguishes between neurons with and without C-fibre inputs. *Pain*. 2008;134(1):32-40.

Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*. 2011; 152(3 Suppl):18.

Yaksh TL. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids. *Brain Research*. 1988;458(2):319-24.

Yamato M, Kaneda A, Kataoka Y. Low-level laser therapy improves crescentic glomerulonephritis in rats. *Lasers Med Sci*. 2012.

Yan W, Chow R, Armati PJ. Inhibitory effects of visible 650 - nm and infrared 808 - nm laser irradiation on somatosensory and compound muscle action potentials in rat sciatic nerve: implications for laser - induced analgesia. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2011; 16(2):130-5.

Zambelli VO, Fernandes AC, Gutierrez VP, Ferreira JC, Parada CA, Mochly-Rosen D, Cury Y. Peripheral sensitization increases opioid receptor expression and activation by crotalphine in rats. *PLoS One*. 2014;9(3).

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16(2):109-10.

Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 2001;429(1-3):23-37.

Zöllner C, Stein C. Opioids. *Analgesia*. 2007:31-63.