
Mara Evany de Oliveira Silva

**Avaliação da radiação LASER AsGa 904nm sobre o processo álgico 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

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 (κ), 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.

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. Nesses 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 inibi 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 (k), todos amplamente distribuídos em diversos sistemas como, por exemplo, no sistema imunológico, neuroendócrino (pineal e suprarenal), em células ectodermal, 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: Oxycodona 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 conseqüente diminuição da dor neuropática, um exemplo disso é a oxycodona, 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 Periaquedotal (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 induzís 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 micorganismos, 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, IL4, 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 conseqüente 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 conseqüente 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 álgicos, 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 às 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 á 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 do 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).

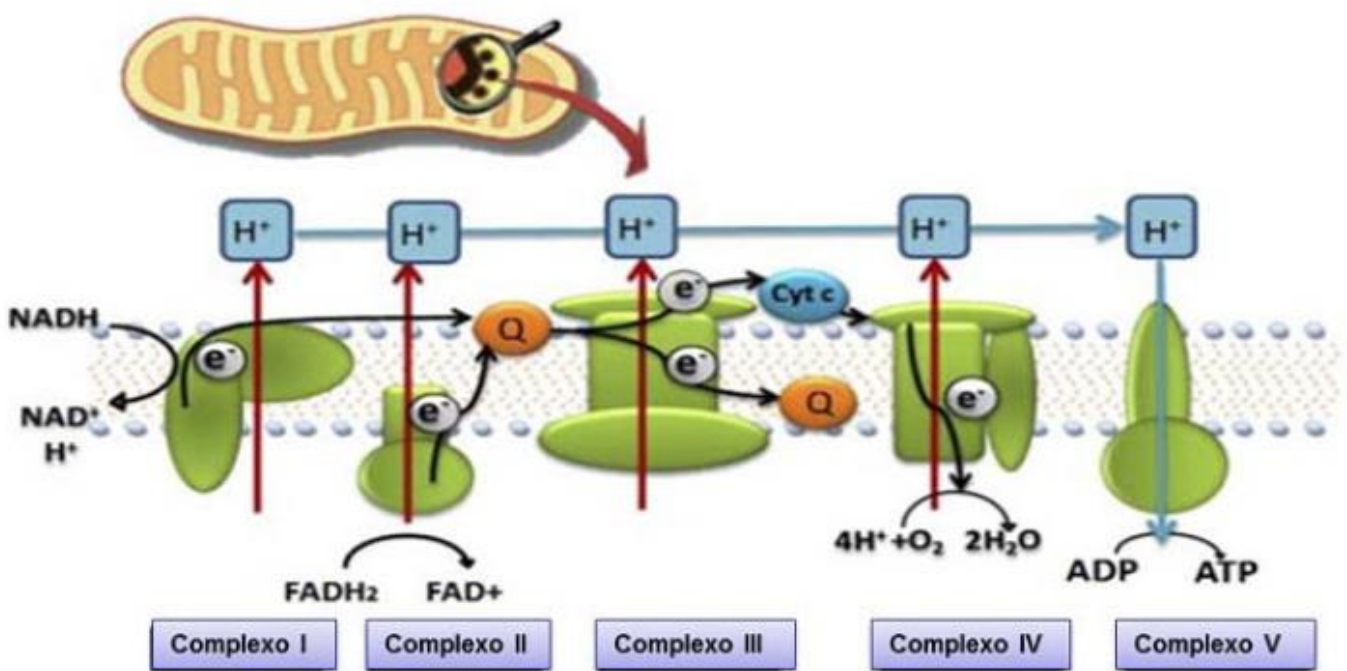


Figura 1- Nas célula eucariótica as mitocôndrias são consideradas os geradores de energia da, onde ocorre a conversão de oxigênio e nutrientes através do processo de fosforilação oxidativa e da cadeia de transporte de elétrons em trifosfato de adenosina (ATP), como mostrado na figura acima. Em tecido 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 neuropátias 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.

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. mu-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 PD, Wall PD, editors. *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. 1a Ed, 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 AK, Azeiteiro MH. *Imunologia Básica Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico;* 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.

Masoumpoor 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 Paraíba;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, Thompson 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.