Igor Rafael Correia Rocha

**Efeito da fotobioestimulação na neuropatia periférica de ratos
com diabetes *mellitus* tipo 1 induzido por estreptozotocina**

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
2017

Igor Rafael Correia Rocha

**Efeito da fotobioestimulação na neuropatia periférica de ratos
com diabetes *mellitus* tipo 1 induzido por estreptozotocina**

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: Prof^a. Dr^a. Marucia Chacur

Versão Corrigida

A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na biblioteca digital de teses e dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Rocha, Igor Rafael Correia
Efeito da fotobioestimulação na neuropatia
periférica de ratos com diabetes mellitus tipo 1
induzido por estreptozotocina / Igor Rafael Correia
Rocha; orientador Marucia Chacur. -- São Paulo,
2017.
60 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Nocicepção. 2. Laserterapia. 3. Diabetes
mellitus . 4. Citocinas. I. Chacur, Marucia,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Igor Rafael Correia Rocha

Titulo da Dissertação/Tese: Efeito da fotobioestimulação na neuropatia periférica de ratos com diabetes mellitus tipo 1 induzida por estreptozotocina

Orientador: Professora Doutora Marucia Chacur.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária Armand de Siles Oliveira, Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2412 - Cx. 05508-000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7000 - e-mail: ceba@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Efeito da Fotobioestimulação na neuropatia periférica de ratos com diabetes mellitus tipo 1 induzida por estreptozotocina*", registrado sob o protocolo nº **123/2015**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **14/12/2015** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Marucia Chacur**
- Membros da Equipe: **Igor Rafael Correia Rocha (Iniciação científica)**

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Photobiostimulation Effect on peripheral neuropathy in rats with type 1 diabetes mellitus induced by streptozotocin*", protocol nº **123/2015**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **12/14/2015** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Marucia Chacur**
- Team members: **Igor Rafael Correia Rocha (Undergraduate Student)**

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Ratus Norvegicus</i>	Wistar	Macho/Male	2 meses/months	180

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

Dedico este trabalho à minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho e me ajudaram a torná-lo possível.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Marucia Chacur pelo apoio, incentivo, confiança, carinho e dedicação por mim. Professora, sou eternamente grato por ter a Senhora fazendo parte da minha VIDA e não só da minha formação!

À minha grande amiga Aline Kelly que mesmo tão distante pude sentir a presença dela e todo seu carinho por mim nas nossas conversas por whatsapp e telefone! Kelly, sou muito feliz por ter uma amiga como você! E como sempre te falo, desejo levar esta amizade até meu último dia! Muito Obrigado pelo seu carinho, atenção e paciência.

Agradeço a todos os amigos do lab, **em especial Milena, Mara, Daniel** e aos demais do grupo Bia, Alyne, Joyce. Estas foram as primeiras pessoas com quem tive contato e muito aprendi. Muito Obrigado a todos vocês por toda paciência e por terem me incluído tão amavelmente na família. A Regina, uma pessoa muito especial e quem me ensinou a fazer as primeiras soluções no lab.

Agradeço ao Prof^o Dr^o Adriano Cienna pela colaboração no projeto e por toda a equipe do Laboratório Multiusuário do Departamento de Anatomia: Sonia, Marta e Boleta.

Agradeço de todo o coração ao Adilson e ao laboratório do Prof^o Dr^o Britto que estiveram sempre de portas abertas e que também de forma tão carinhosa me receberam de braços abertos no laboratório.

Agradeço, acima de tudo, à minha mãe (Vania). Espero ser motivo de orgulho para você, porque afinal, você é tudo que me importa. Ao meu pai (Gel) e ao meu irmão, Zé.

Ao Depto de Anatomia e ao Programa de Pós - Graduação em Ciências Morfofuncionais e ainda a todos os profissionais do departamento por terem dado suporte para a realização deste projeto e no dia-a-dia acadêmico, especialmente à Patrícia, aos técnicos de anatomia do bloco didático, em especial Nilson e Milton, e ainda, aos funcionários do Biotério da Anatomia, sobretudo ao Renivaldo.

A todos os professores do departamento de anatomia e do programa de Pós Graduação em Ciências Morfofuncionais, especialmente à Prof^a Dr^a Maria Luiza, ao Prof^o Dr^o Julio Cesar e ao Prof^o Dr^o Edson Liberti.

Muito obrigado a todos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP que tornou possível a realização deste projeto inscrito no processo de número 2016/00038-6.

It is only through historical study that one can really appreciate new ideas, see the faults in existing theories, and determine the best path to follow for innovative new research.

Johann Wolfgang von Goethe

RESUMO

Rocha IRC. Efeito da fotobioestimulação na neuropatia periférica de ratos com diabetes mellitus tipo 1 induzida por estreptozotocina. [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2017.

O diabetes *mellitus* é uma doença crônica com mais de 3500 anos de história na qual sua primeira descrição é encontrada no mais antigo tratado médico escrito pela civilização egípcia, o papiro de Ebers. O diabetes *mellitus* é uma síndrome metabólica caracterizada por aumento significativo nos níveis de glicose na circulação sanguínea, condição conhecida por hiperglicemia. O estado hiperglicêmico danifica estrutural e fisiologicamente as fibras nervosas periféricas ocasionando a neuropatia diabética periférica (processo degenerativo). Esta neuropatia leva o paciente, a uma vida cheia de limitações e incapacidades. As principais queixas apresentadas quanto à neuropatia diabética periférica é a dor crônica, alteração motora e significativa falta de sensibilidade nos membros periféricos, podendo resultar em algumas situações com a amputação do membro inferior. Cabe mencionar que não há na clínica tratamento com foco na degeneração periférica ocasionada pelo diabetes *mellitus* tipo 1, assim como não há tratamento eficaz para a melhora do quadro nociceptivo (dor), daí a necessidade da pesquisa sobre outras modalidades terapêuticas que devolvam e restaurem a qualidade de vida daqueles acometidos por tal doença. Neste projeto foi utilizado o modelo de neuropatia diabética periférica por diabetes *mellitus* tipo 1 induzida pela administração de estreptozotocina e sugerido como proposta de tratamento a técnica de laserterapia para interferir no processo de degeneração das fibras nervosas periféricas assim como, na melhora do quadro nociceptivo (dor) analisado pelos modelos de alodinia tátil, hiperalgesia mecânica e hiperalgesia térmica antes, durante e depois do tratamento proposto. O presente estudo demonstrou que a técnica de laserterapia como proposta de tratamento além de melhorar o quadro nociceptivo foi capaz de modular algumas citocinas (interleucinas) pró e antiinflamatórias (TNF α , IL-6, IL-10) no nervo isquiático de ratos diabéticos tratados com a referida técnica. Ainda, em relação às fibras nervosas periféricas, a técnica de laserterapia reverteu o processo degenerativo de tais fibras, representado pela modulação das proteínas estruturais como a laminina e a proteína zero. A técnica de laserterapia também foi capaz de modular os receptores dos produtos finais da glicação avançada (RAGE), um importante componente ativador do fator de transcrição nuclear NF- κ B responsável por induzir a liberação de citocinas (interleucinas) pró-inflamatória no nervo isquiático de ratos diabéticos. Os resultados observados demonstraram significativamente a eficácia da técnica de laserterapia como proposta útil para o tratamento da neuropatia diabética periférica. Porém, é necessário que mais estudos sejam realizados a fim de melhor elucidar os mecanismos moleculares que medeiam o efeito terapêutico da técnica de laserterapia.

Palavras-chave: Nocicepção. Laserterapia. Diabetes *mellitus*. Citocinas.

ABSTRACT

Rocha IRC. Effect of photobiostimulation on peripheral neuropathy of rats with type 1 diabetes mellitus induced by streptozotocin. [Master thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Diabetes mellitus is a chronic disease with more than 3,500 years of history in which its first description is found in the oldest medical treatise written by the Egyptian civilization, the Ebers papyrus. Diabetes mellitus is a metabolic syndrome characterized by a significant increase in glucose levels in the bloodstream, a condition known as hyperglycemia. The hyperglycemic state damages the peripheral nerve fibers structurally and physiologically, causing peripheral diabetic neuropathy (degenerative process). This neuropathy leads to the patient, a life full of limitations and incapacities. The main complaints regarding peripheral diabetic neuropathy are chronic pain, motor impairment and significant lack of sensation in the peripheral limbs, resulting fatally in some situations with lower limb amputation. It should be mentioned that there is no treatment in the clinic with a focus on the peripheral degeneration caused by type 1 diabetes mellitus, as there is no effective treatment for the improvement of the nociceptive (pain) situation, hence the need for research on other therapeutic modalities that return and restore quality of life of those affected by this disease. In this project, the model of diabetic peripheral neuropathy due to type 1 diabetes mellitus induced by the administration of streptozotocin was used and the proposed technique of laser therapy to interfere in the process of degeneration of the peripheral nerve fibers as well as in the improvement of the nociceptive) analyzed by the models of tactile allodynia, mechanical hyperalgesia and thermal hyperalgesia before, during and after the proposed treatment. The present study demonstrated that the laser therapy technique as a treatment proposal for peripheral diabetic neuropathy in an animal model of type 1 diabetes mellitus induced by streptozotocin in addition to improving the nociceptive condition (pain) was able to modulate some pro-and anti-inflammatory cytokines (interleukins) (TNF α , IL-6, IL-10) on the sciatic nerve of diabetic rats treated with said technique. Still, in relation to peripheral nerve fibers, the laser therapy technique reversed the degenerative process of these fibers, represented by the modulation of the laminin and zero protein structural proteins. The laser therapy technique was also capable of modulating advanced glycation end-receptor (RAGE) receptors, an important activating component of the NF- κ B nuclear transcription factor responsible for inducing the release of proinflammatory cytokines (interleukins) in rats' sciatic nerve diabetics. The results showed a significant efficacy of the laser therapy technique as a useful proposal for the treatment of peripheral diabetic neuropathy. However, further studies are needed to better elucidate the molecular mechanisms that measure the therapeutic effect of the laser therapy technique.

Keywords: Nociception. Laser therapy. Diabetes *mellitus*. Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Técnica de laserterapia. Ilustração do aparelho e parâmetros utilizados para a aplicação da técnica de laserterapia.....	27
Figura 2 – Teste de Alodinia – filamentos de <i>Von Frey</i> . Ilustração do teste de sensibilidade tátil utilizado para acessar os limiares de alodinia em ratos.....	28
Figura 3 – Teste de <i>Hargreaves</i> . Ilustração do teste plantar térmico utilizado para acessar os limiares de hiperalgesia térmica em ratos.....	29
Figura 4 – Teste de pressão da pata por <i>Randall e Sellito</i> . Ilustração do teste de pressão da pata utilizado para acessar os limiares de hiperalgesia mecânica em ratos.....	30
Figura 5 - Caracterização do modelo de diabetes mellitus tipo 1 induzido por estreptozotocina.....	33
Figura 6 – Efeito da hiperglicemia induzida por estreptozotocina no perfil glicêmico de ratos.....	34
Figura 7 – Efeito da hiperglicemia induzida por estreptozotocina no peso corporal de ratos ao longo de 60 dias.....	35
Figura 8 – Caracterização da alodinia tátil induzida pela hiperglicemia e tratamento com a técnica de laserterapia.....	36
Figura 9 – Caracterização da hiperalgesia térmica e tratamento com a técnica de laserterapia.....	36
Figura 10 – Caracterização da hiperalgesia mecânica e tratamento com a técnica de laserterapia.....	37
Figura 11 – Morfologia do nervo isquiático de ratos por microscopia eletrônica de transmissão.....	38
Figura 12 – Efeito da técnica de laserterapia sobre a expressão das proteínas estruturais laminina e proteína zero (P0).....	39
Figura 13 – Efeito da técnica de laserterapia sobre o receptor para os produtos finais de glicação avançada (RAGE).....	40
Figura 14 – Efeito da técnica de laserterapia sobre a expressão de citocinas (interleucinas) pró (IL-6, TNF α) e antiinflamatória (IL-10) no nervo isquiático de ratos.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificações sobre os parâmetros utilizados para a aplicação da técnica de laserterapia.....	27
Tabela 2 – Lista de anticorpos primários utilizados para a análise de expressão protéica pela técnica de <i>Western blotting</i>	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
STZ	Estreptozotocina
DM	Diabetes mellitus
LLLT	Low - level laser therapy (laserterapia de baixa intensidade)
IL-6	Interleucina - 6
IL-10	Interleucina – 10
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
RAGE	Receptor dos produtos finais de glicação avançada
TA	Temperatura ambiente
d	dias
MI	Medida inicial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1.1	DIABETES MELLITUS: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	16
1.2	NEUROPATIA DIABÉTICA PERIFÉRICA.....	18
1.3	USO DA FOTOBIOESTIMULAÇÃO EM PROCESSO NOCICEPTIVO E DEGENERATIVO.....	20
1.4	JUSTIFICATIVA.	23
2	OBJETIVOS.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	25
3.2	ANIMAIS.....	25
3.3	INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS TIPO 1.....	25
3.4	VERIFICAÇÃO GLICÊMICA E MASSA CORPORAL.....	26
3.5	PROCEDIMENTO TERAPÊUTICO – LASERTERAPIA.....	26
3.6	AValiação da SENSIBILIDADE DOLOROSA.....	28
3.7	ENSAIO DE ALODINIA TÁTIL.....	28
3.8	ENSAIO DE HIPERALGESIA TÉRMICA.....	29
3.9	ENSAIO DE HIPERALGESIA MECÂNICA.....	29
3.10	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	30
3.11	ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTÉICA – <i>WESTERN BLOTTING</i>	30
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5	RESULTADOS.....	33
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE DIABETES MELLITUS TIPO 1 INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA.....	33
5.2	EFEITO DA ESTREPTOZOTOCINA NO PERFIL GLICÊMICO DE RATOS.....	34
5.3	EFEITO DA HIPERGLICEMIA INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA SOBRE A MASSA CORPORAL DE RATOS.....	34
5.4	EFEITO DA TÉCNICA DE LASERTERAPIA SOBRE AS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS.....	35
5.4.1	<i>EFEITO DO TRATAMENTO COM LASER SOBRE A RESPOSTA TÁTIL.....</i>	<i>35</i>
5.4.2	<i>EFEITO DO TRATAMENTO COM LASER SOBRE A RESPOSTA AO ESTÍMULO TÉRMICO.....</i>	<i>36</i>

5.4.3	<i>EFEITO DO TRATAMENTO COM LASER SOBRE A RESPOSTA AO ESTÍMULO MECÂNICO</i>	37
5.5	EFEITO DO LASER NAS FIBRAS NERVOSAS PERIFÉRICAS.....	37
5.5.1	<i>EFEITO DA TÉCNICA DE LASERTERAPIA NA REGENERAÇÃO DE FIBRAS NERVOSAS PERIFÉRICAS – AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS LAMININA E PROTEÍNA ZERO</i>	38
5.6	EFEITO DA TÉCNICA DE LASERTERAPIA SOBRE O RECEPTOR RAGE.....	39
5.7	EFEITO DA TÉCNICA DE LASERTERAPIA SOBRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS (INTERLEUCINAS) PRÓ (TNF α , IL-6) E ANTIINFLAMATÓRIA (IL-10) NO NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS.....	40
6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS*	49
	ANEXOS	53
	ANEXO A: ARTIGO PUBLICADO COM DADOS REFERENTES AO TRABALHO.....	54
	ANEXO B: ARTIGO PUBLICADO EM COLABORAÇÃO.....	55

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Diabetes mellitus: considerações gerais

Segundo dados do *International Diabetes Federation* (IDF) a cada sete segundos morrem pessoas com diabetes *mellitus* e em 2014 foram 4.9 milhões de mortes (Atlas, 2013). A história do diabetes *mellitus* – descoberta, descrição e tratamento – é uma crônica notável que remonta 3.500 anos de história médica (Spectrum, 2002). A história do diabetes se desenvolve durante a antiguidade, onde foi possível observar as primeiras descrições dos sinais e sintomas da doença. Acredita-se geralmente que por mais de 2.000 anos antes do nascimento de Hipócrates (pai da medicina), médicos egípcios tinham se esforçado para diagnosticar e tratar a referida doença. A primeira referência ao diabetes *mellitus* é atribuído ao Papiro de Ebers (documento importante sobre a prática médica escrito provavelmente entre 3400 e 1550 aC no Egito Antigo) o qual menciona remédios para o excesso de micção, ou seja, remédios para “eliminar urina” em excesso (Spectrum, 2002). É de Aretaeus (discípulo de Hipócrates) a célebre frase “O diabetes é uma afecção extraordinária na qual os tecidos e membros se dissolvem em urina”, é de sua autoria a descrição dos principais sinais e sintomas do diabetes e também ele o primeiro a utilizar o termo diabetes. Os primeiros a identificar o sabor doce da urina daqueles com diabetes foram os fisiatras hindus Charaka, Susruta e Vagbhata e também foram eles os primeiros a descreverem a poliúria e a glicosúria. Nenhum progresso foi feito quanto ao entendimento do diabetes até o século XVI. Entre os anos de 1674 e 1776 foram os pesquisadores Willi e Dobson que conclusivamente estabeleceram o diagnóstico do diabetes na presença de “açúcar” no sangue e na urina. O período experimental do diabetes começa na metade do século XIX onde Langerhans fala pela primeira vez sobre as ilhotas pancreáticas que consequentemente receberam seu nome Ilhotas de Langerhans, porém o mesmo não sabia a utilidade de tais células sem dutos secretores. Ao final do século XIX Oscar Minkowski demonstrou que ao retirar o pâncreas do cachorro este desenvolvia diabetes fatal. Sucessivamente ao trabalho de Minkowski, os pesquisadores Frederick G. Banting e Charles H. Best descobriram e isolaram a molécula de insulina na Universidade de Toronto (Canadá) entre os anos de 1921 e 1922 tornando possível a continuação da vida daqueles acometidos pelo diabetes mellitus (Spectrum, 2002).

O diabetes *mellitus* é uma doença crônica que ocorre quando o corpo não produz insulina ou quando se torna resistente a tal hormônio (Harris, 1988). A insulina é um hormônio produzido no pâncreas que permite que a glicose entre nas células do corpo, onde será convertida em energia (produção de ATP). Pessoas diabéticas não absorvem a glicose

adequadamente e esta glicose que permanece em circulação no sangue (condição conhecida como hiperglicemia) é prejudicial aos tecidos corporais ao longo do tempo, em especial o tecido nervoso (neuropatia diabética). A hiperglicemia crônica causa danos irreversíveis ao sistema nervoso (em especial as fibras nervosas dos membros periféricos) levando aqueles acometidos por tal doença a uma vida cheia de complicações e incapacidades. Existem três tipos de diabetes, o diabetes gestacional, o diabetes *mellitus* tipo 2 e o diabetes *mellitus* tipo 1.

O diabetes gestacional tende a ocorrer na 24ª semana de gestação, onde as mulheres desenvolvem uma resistência à insulina durante a gravidez. Esta condição surge porque a ação da insulina é bloqueada, provavelmente por hormônios produzidos pela placenta. Como o diabetes gestacional normalmente se desenvolve mais tarde na gravidez, o feto já está bem formado, mas ainda em crescimento. O risco imediato para o bebê não é, portanto, tão grave como para aqueles cuja mãe tinha diabetes *mellitus* tipo 1 ou diabetes *mellitus* tipo 2 antes da gravidez. No entanto, o diabetes gestacional não controlado pode ter graves consequências tanto para a mãe quanto para seu bebê. Os níveis de glicose elevados no sangue quando mal administrada durante a gravidez pode levar a uma série de riscos significativos ao bebê, como por exemplo, a pré-eclâmpsia, condição em que a pressão arterial das mães se eleva, pondo em risco a vida de ambos. O diabetes gestacional normalmente desaparece após o nascimento. No entanto, as mulheres que tiveram diabetes gestacional correm um risco maior de desenvolver diabetes gestacional em gestações subsequentes e de desenvolver diabetes *mellitus* tipo 2 mais tarde na vida. Os crianças nascidas de mães com diabetes gestacional também têm um risco de vida mais elevado de obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2 durante seu desenvolvimento (Atlas, 2013).

O diabetes *mellitus* tipo 2 é o tipo mais comum do diabetes. Ocorre geralmente em adultos, mas é cada vez mais visto em crianças e adolescentes. Neste tipo de diabetes, o corpo é capaz de produzir insulina, porém a quantidade não é suficiente ou o corpo é incapaz de responder aos seus efeitos, ou seja, torna-se resistente à ação da insulina, que conduz a uma acumulação de glicose no sangue. Muitas das pessoas com diabetes *mellitus* tipo 2 permanecem sem o conhecimento de sua doença por um longo período de tempo porque os sinais e sintomas podem levar anos para aparecer ou ser reconhecido, tempo este em que o corpo sofre danos por excesso de glicose no sangue. Embora as razões para o desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo 2 ainda não são conhecidas, existem vários fatores de risco importantes. Esses incluem: obesidade, má alimentação, inatividade física, envelhecimento, histórico familiar de diabetes entre outros. A maioria das pessoas com diabetes do tipo 2 geralmente não requerem doses diárias de insulina para sobreviver. Muitas

pessoas são capazes de gerir a sua condição através de uma dieta saudável e aumento da atividade física ou medicação oral. No entanto, se eles são incapazes de regular os seus níveis de glicose no sangue, pode haver prescrição de insulina. O número de pessoas com diabetes tipo 2 está crescendo rapidamente em todo o mundo. Este aumento está associado com o desenvolvimento econômico, o envelhecimento da população, a urbanização crescente, mudanças na dieta, atividade física reduzida, e as mudanças no estilo de vida (Atlas, 2013).

O diabetes *mellitus* tipo 1 é causado por uma reação auto - imune, em que o sistema de defesa do corpo ataca as células beta produtoras de insulina no pâncreas. Como resultado, o corpo já não pode produzir a insulina que necessita. O motivo pelo qual ocorre essa reação auto – imune contra as células beta do pâncreas não é totalmente compreendido. A doença pode afetar pessoas de qualquer idade, mas geralmente ocorre em crianças ou adultos jovens. As pessoas com esta forma de diabetes precisam de insulina todos os dias de modo a controlar os níveis de glicose no sangue. Sem insulina, uma pessoa com diabetes *mellitus* tipo 1 desenvolve suas complicações mais debilitantes e incapacitantes ao longo da vida e fatalmente morre. O diabetes *mellitus* tipo 1 apresenta sintomas tais como: sede em excesso, micção freqüente, falta de energia e consequentemente cansaço extremo, fome constante, repentina perda de peso, processo para cicatrização de feridas muito lento, infecções recorrentes, problemas visuais entre outros. O número de pessoas que desenvolvem diabetes *mellitus* tipo 1 está a aumentando significativamente, e as razões para tal ocorrência ainda não são claras (Atlas, 2013).

1.2 Neuropatia diabética periférica

A neuropatia diabética periférica (NDP) é uma complicação comum e devastadora do diabetes *mellitus*, com grande variedade de manifestações clínicas. Afeta atualmente 60% daqueles acometidos por este tipo de diabetes (Juranek et al., 2015) e é caracterizada por expressivo dano aos nervos periféricos. O tipo mais comum e prevalente é o que apresenta uma disfunção sensitiva – motora dos membros inferiores, apresentando quadro severo de dor decorrente da neuropatia crônica desenvolvida pelo quadro de hiperglicemia (Singh et al., 2014).

A grande vulnerabilidade do sistema nervoso periférico (SNP) quanto as complicações do diabetes *mellitus* tipo 1 em relação aos demais tecidos ocorre provavelmente devido a sua estrutura, função e/ou a exclusivas necessidades metabólicas (Zenker et al., 2013). Cabe mencionar que a principal função do SNP é a de comunicação com o sistema nervoso central por meio de sinais elétricos transmitidos por fibras mielínicas (fibras A δ , A β) e amielínicas

(fibras C). Outro aspecto importante na neuropatia diabética periférica é que ambas as fibras nervosas, sejam elas de pequeno ou grande calibre, mielínicas ou amielínicas são indiscriminadamente afetadas pela hiperglicemia. Há quatro hipóteses que estão relacionadas com as complicações (danos aos nervos periféricos) decorrentes da hiperglicemia no diabetes *mellitus*: 1-aumento na via dos polióis; 2-ativação da proteína C quinase; 3-aumento na via das hexosaminas e 4-aumento na formação dos produtos finais de glicação avançada (AGE) e consequentemente aumento na expressão e ativação dos receptores para os produtos finais de glicação avançada (RAGE) (Brownlee, 2001).

Sabe-se hoje que a produção aumentada de superóxido pela cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias é uma provável ideia que une as quatro hipóteses anteriormente citadas, uma vez que vários estudos mostram que a hiperglicemia aumenta significativamente o estresse oxidativo (Brownlee, 2001). A hiperglicemia induz mudanças nas mitocôndrias, como a liberação de citocromo c, alteração na biogênese e fissão mitocondrial e consequentemente a morte celular. A entrada excessiva de glicose na célula causa sobrecarga na cadeia transportadora de elétrons, gerando oxidantes na mitocôndria e consequentemente redução no potencial de ação mitocondrial e diminuição na síntese de ATP (Yagihashi et al., 2011).

O receptor para os produtos finais de glicação avançada (RAGE) é uma proteína de aproximadamente 45 kDa. É membro da superfamília das imunoglobulinas de superfície celular e possui três domínios: um tipo V (variável) e dois tipos C (constante) que são extracelulares e ainda outras duas regiões de fundamental participação na sinalização celular: uma região transmembranica de ancoragem que o fixa na membrana celular e outra região conhecida por cauda citosólica contendo 43 aminoácidos (Schmidt et al., 2001).

O RAGE é expresso em vários tipos celulares como, por exemplo, endotélio vascular, músculo liso, monócitos, macrófagos e de especial interesse nas células neuronais. Em situações de estresse celular (aumento de atividade), a expressão do RAGE é aumentada nas células afetadas, mostrando-se desta forma um bom marcador de processos inflamatórios (Schmidt et al., 2001). Uma das peculiaridades dos receptores RAGE é a sua capacidade de reconhecer vários ligantes, permitindo desta forma a sua participação em um amplo espectro de eventos fisiopatológicos, principalmente aqueles relacionados à propagação de disfunção celular (Schmidt et al., 2001).

Há um crescente número de informações quanto à expressiva participação dos receptores de RAGE em processos de hiperexcitabilidade de neurônios sensoriais associado ao processo inflamatório desencadeado pela interação AGE/RAGE (Brederson et al., 2016).

Tais receptores também são expressos em células não neuronais como, por exemplo, monócitos e macrófagos atuando na liberação de citocinas pró-inflamatórias ao redor de tais fibras, contribuindo para a geração e manutenção do processo doloroso (Brederson et al., 2016). A ligação AGE-RAGE em vários tipos celulares leva ao estresse oxidativo e ao aumento da concentração do fator de transcrição nuclear NF- κ B (Li e Schmidt, 1997). Este fator de transcrição modula a expressão de moléculas de adesão celular vascular e outros genes relacionados à resposta pró-inflamatórias como, por exemplo, as citocinas (interleucinas) IL-6 e TNF α . (Schmidt et al., 2001).

As citocinas são um grupo de proteínas regulatórias que são produzidas pelas células de defesa no processo imune e inflamatório, destacando-se por efetiva participação na modulação de tais processos. Cabe mencionar que neurônios e/ou células da glia também participam na produção de tais citocinas, dentre elas, aqueles que participam ativamente na geração e manutenção do processo doloroso (citocinas pró-inflamatórias) IL-6 e TNF α (Sommer e Kress, 2004).

Apesar do desenvolvimento de novos fármacos para a inibição da interação AGE/RAGE, não existe nenhuma modalidade terapêutica capaz de reverter o dano causado às fibras nervosas periféricas decorrentes de tal interação. Há a necessidade de novas formas, estratégias e modalidades de tratamento as quais visem a melhora ou até mesmo a reversão das complicações que acometem aqueles indivíduos portadores de diabetes *mellitus* tipo 1.

Uma vez que o laser em diversos trabalhos mostra sua participação no processo de melhora na função mitocondrial (ATP), proliferação celular, processos regenerativos e em quadros de dor, sua utilização como tratamento proposto em relação às complicações causadas pelo diabetes *mellitus* é de relevante interesse na pesquisa por tal doença apresentar as características descritas anteriormente.

1.3 Uso da fotobioestimulação em processo nociceptivo e degenerativo

Albert Einstein, em 1916, descreveu pela primeira vez o fenômeno físico da emissão estimulada de radiação. A palavra Laser é a abreviatura de “Light amplification by stimulated emission of radiation”. É uma forma de radiação não ionizante, altamente concentrada. O resultado depende do tecido irradiado e do tipo de laser utilizado (Nascimento, 2001). O laser de baixa potência tem demonstrado eficiência devido à resposta que produz nos diversos tecidos, como redução do edema, controle do processo inflamatório, aumento da fagocitose, da síntese de colágeno e da epitelização (Ortiz, 2001). A ação da radiação laser de

alta intensidade sobre um tecido se faz através de mecanismos térmicos, com subsequente elevação de sua temperatura. A sua utilização na área biomédica surgiu como consequência natural de suas propriedades; os lasers de alta potência são capazes de vaporizar e coagular os tecidos biológicos, oferecendo um campo cirúrgico sem sangramento e com certo grau de esterilização. A exposição de um corpo à radiação laser em baixa intensidade, com uma densidade de potência de alguns mW/cm^2 , minimiza a possibilidade da manifestação de efeitos térmicos, já que a intensidade utilizada é baixa o bastante para que a temperatura não ultrapasse $37,5\text{ }^\circ\text{C}$ (Ribeiro, 2004). Os efeitos não térmicos produzidos pela radiação de baixa potência são amplamente discutidos, pois de certo modo não são conhecidos todos os mecanismos nem todos os elementos que participam da conversão de energia luminosa em energia bioquímica, capaz de gerar analgesia ou regeneração. Segundo alguns autores, os mecanismos que envolvem o processo de bioestimulação ocorrem em nível molecular. Neste caso, a luz laser penetra no interior do tecido onde é absorvido por determinados cromóforos, resultando no aumento do metabolismo celular através do aumento da síntese de ATP pelas mitocôndrias (Karu, 1999).

O laser de baixa potência promove efeitos semelhantes de modulação da inflamação e analgesia do que a medicação antiinflamatória não esteroide, além de estimular a microcirculação local e a proliferação celular, favorecendo ainda mais os eventos de reparação no pós-operatório (Rochkind et al., 2001; Shamir et al., 2001). A terapia com laser de baixa potência também possui efeitos terapêuticos como, por exemplo, a aceleração de cicatrização (Amorim et al., 2006; Gal et al., 2009), redução da sintomatologia nociceptiva (Albrektsson e Hansson, 1986; de Oliveira Martins et al., 2013), restauração da função neural após o dano, aprimoramento da remodelação e reparo ósseo, normalização da função hormonal, estímulo de liberação de endorfina e modulação do sistema imune (Milorio et al., 2002; Rochkind et al., 2007).

Ainda há na laserterapia grande controvérsia quanto à dose correta para aplicação em cada doença específica. Encontram-se muitos parâmetros em fase de análise experimental, tais como a dose a ser utilizada, o tempo de aplicação do laser, o tempo de tratamento, a densidade de energia, a frequência de aplicações, as características do aparelho, o sistema óptico, o feixe de luz, a transmissão, a dispersão, a absorção e a profundidade do tecido tratado (Kreisler et al., 2002; Tuner e Hode, 1998).

A utilização do laser de baixa intensidade para o tratamento de dor apresentado por aqueles acometidos por diabetes *mellitus* tanto tipo 1 quanto tipo 2 foi primeiramente utilizado na Europa e Rússia por volta dos anos 1960 (Sunahara et al., 2014). Foi desta

pioneira utilização que a ideia de que qualquer efeito biológico causado pelo laser era devido a efeitos diretos da radiação fotônica e não de processos térmicos como se pensava (Ohshiro e Calderhead, 1991). O mecanismo pelo qual o tratamento com laser de baixa intensidade ocasiona melhora no quadro de nocicepção apresentados por pacientes diabéticos ainda é desconhecido. No caso de dor neuropática as prováveis hipóteses são de uma possível liberação local de neurotransmissores como a serotonina (Walker, 1983), aumento na produção mitocondrial de ATP (Passarella, 1989), aumento na liberação de endorfinas (Yamamoto et al., 1988) e também na liberação local de citocinas com ação antiinflamatórias, como por exemplo a interleucina 10 (IL-10) (Da Re Guerra et al., 2016).

Baseado nestes resultados e nas possíveis considerações apresentadas, o estudo do efeito do laser de baixa intensidade em modelo de neuropatia diabética periférica induzida por diabetes *mellitus* tipo 1, é de grande relevância, visto a deficiência de formas de tratamento que objetivem a degeneração periférica assim como a carência de conhecimento sobre o mecanismo de ação hiperglicemia/degeneração. Contudo, se faz necessário o conhecimento sobre a ação benéfica da luz (laserterapia) em diversas funções celulares que ainda estão longe de serem conclusivamente elucidadas.

1.4 Justificativa

Apesar de o controle glicêmico ser efetivo contra as complicações crônicas ocorridas devido a hiperglicemia no diabetes *mellitus* tipo 1, ainda observamos em grande escala, a necessidade do uso de uma vasta classe de analgésicos para o tratamento da dor crônica decorrente da neuropatia diabética periférica mesmo após a normalização do estado hiperglicêmico. Cabe mencionar que não existe um único tratamento eficaz contra a dor crônica na neuropatia diabética periférica e menos ainda observamos tratamento dedicado aos processos de desmielinização (processo degenerativo). Desta forma é necessário o estudo de tratamentos alternativos, que possam ser aliados aqueles já existentes, para tentar reverter tanto o quadro nociceptivo crônico quanto os processos degenerativos característicos da doença.

Para tanto, pretendemos analisar a participação do laser de baixa potência em um possível processo de regeneração das fibras nervosas periféricas e melhora no quadro de dor em modelo animal diabetes *mellitus* tipo 1 induzido por estreptozotocina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

A presente proposta teve como objetivo geral a análise da participação da técnica de laserterapia sobre o processo regenerativo das fibras nervosas periféricas assim como sua participação na melhora do quadro de dor crônica em modelo animal de diabetes *mellitus* tipo 1 induzido por estreptozotocina.

2.2 Objetivos específicos:

- Analisar a morfologia do nervo isquiático antes e após tratamento com a técnica de laserterapia através de imagens de microscopia eletrônica de transmissão;
- Analisar e quantificar as proteínas estruturais laminina e proteína zero no nervo isquiático pelo método de *Western Blotting*;
- Analisar e quantificar o receptor para os produtos de glicação avançada (RAGE) no nervo isquiático pelo método de *Western Blotting*;
- Analisar e quantificar as citocinas (interleucinas) pró (TNF- α , IL-6) e antiinflamatórias (IL-10) no nervo isquiático pelo método de *Western Blotting*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Os animais foram alocados conforme divisão dos grupos abaixo. Todos os animais foram inicialmente submetidos aos testes comportamentais. Em seguida, foi induzido o diabetes *mellitus* tipo 1 nos animais e posteriormente (a partir do 60º dia) os mesmos foram tratados com laser GaAs (Arseneto de Gálio, Laserpulse-Laser Ibramed) emitindo comprimento de onda de 904 nm, potência de saída de 70 mW e 60 mJ; os grupos salina e diabético (STZ) não receberam nenhum tratamento. Após todos os procedimentos os animais foram eutanasiados e em seguida, foi coletado e armazenado o nervo isquiático para análises bioquímicas e estruturais.

Grupo 1 – Naive: grupo controle

Grupo 2 – Salina: animais que receberam somente o veículo de diluição (solução salina 0,9%) da estreptozotocina por via intraperitoneal;

Grupo 3 – Diabético (STZ): animais com diabetes *mellitus* tipo 1 induzida por estreptozotocina por via intraperitoneal;

Grupo 4 – Diabético + Laser (STZ+LLLT): animais diabéticos tratados com a técnica de laserterapia.

3.2 Animais

Os animais (ratos machos *Wistar*) provenientes do Biotério de Produção de Ratos (ICB, Rede USP de Biotérios) foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia e utilizados de acordo com certificado aprovado pela CEUA ICB (123/2015) e normas estabelecidas pelo CONCEA. Todos os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada, com isolamento acústico, temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ciclo claro/escuro (12h: 12h). Para a realização dos experimentos, os animais foram manipulados considerando os princípios e o guia de uso de animais de laboratório envolvendo dor e nocicepção (Zimmermann, 1983).

3.3 Indução do diabetes mellitus tipo 1

Para a indução do diabetes *mellitus* tipo 1 utilizamos estreptozotocina (STZ) nas doses de 55, 70 e 85 mg/kg. Estas doses estão baseadas em análises previamente realizadas pelo nosso grupo. Após escolha da dose que melhor caracterizou o quadro nociceptivo, a administração da STZ foi realizada por injeção única via intraperitoneal, diluída em 500 μL de solução salina (0,9%) por animal. Em seguida, os animais foram submetidos aos ensaios

comportamentais para avaliação da resposta nociceptiva ao longo de aproximadamente trinta dias.

3.4 Verificação de glicemia e massa corporal

Para controle glicêmico foi utilizado um glicosímetro portátil da Ultramini/Onetouch. A coleta de sangue para a verificação de glicemia foi feita através de uma única punção na ponta da cauda do rato com agulha 0,30x13 mm (30G). Este procedimento foi realizado no período da manhã (as 8 horas) em dois momentos: pós-pandrial e após jejum de 12 horas. Foram considerados hiperglicêmicos (diabéticos) aqueles que apresentaram glicemia igual ou maior a 200 mg/dl.

Para verificação da massa corporal, os ratos foram pesados também no período da manhã (as 8 horas) em estado pós-prandial com uso de balança eletrônica disponível no biotério do próprio departamento. Foram verificadas as medidas (massa) iniciais e após 30 e 60 dias da administração da estreptozotocina (STZ).

3.5 Procedimento terapêutico - laserterapia

Para o tratamento dos animais, utilizamos como modalidade terapêutica a técnica de laserterapia adaptada em nosso laboratório- Neuroanatomia Funcional da Dor (tabela 1), conforme artigos publicados (Rocha et al., 2017) (de Oliveira Martins et al., 2013). 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 (figura 1). Após a anestesia, iniciamos o tratamento dos animais posicionando a caneta emissora do laser na região da pata padronizada para o estudo (pata direita). Na tabela 1 podemos observar as principais informações quanto ao aparelho Laser Pulse Ibramed, que foi utilizado para o procedimento da técnica de laserterapia assim como dosimetria e demais informações. A primeira sessão de laserterapia foi iniciada no sexagésimo (60º) dia após indução do diabetes *mellitus* tipo 1 e a seguir, os animais foram tratados em dias intercalados, ou seja, dia sim, dia não, somando um total de 10 sessões de laserterapia. No final do procedimento, os animais foram eutanasiados e o nervo isquiático coletado para posteriores análises. Cabe mencionar, que ao longo das sessões de laser os animais passaram por análise comportamental, porém em dias que antecedem a próxima sessão de laser.

Tabela 1 – Especificações sobre os parâmetros utilizados para a aplicação da técnica de laserterapia.

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
Frequencia [Hz]	9500 Hz
Duração do pulso [sec]	60 ns
Forma do feixe	Circular
PARAMETROS PARA O TRATAMENTO	
Potência média	45mW . densidade de potência = 225mW/cm ²
Tamanho do feixe no ponto alvo [cm ²]	0.13 cm ²
Tempo de exposição [sec]	18 segundos por ponto; 162 segundos total
Exposição radiante [J/cm ²]	6.23 J/cm ²
Energia [J]	0.81 J
Número de pontos irradiados	9
Área irradiada [cm ²]	1.17 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]	7,29 J por sessão; 72,9J ao total das sessões

Figura 1 – Técnica de laserterapia. Ilustração do aparelho e parâmetros utilizados para a aplicação da técnica de laserterapia.

3.6 Avaliação da sensibilidade dolorosa

Em todos os testes comportamentais os ratos foram inicialmente habituados por trinta minutos, durante os três primeiros dias que antecederem os experimentos, e no dia do ensaio, por 10 minutos antes do início do mesmo. Ainda, todos os testes foram realizados em “duplo cego”. Todos os testes comportamentais foram analisados antes da indução do diabetes *mellitus* tipo 1 para obtenção da medida inicial, durante o desenvolvimento da própria doença e ao longo do tratamento com a técnica de laserterapia, com a finalidade de avaliar se este tratamento é ou não eficaz na melhora da resposta nociceptiva. Os resultados foram avaliados por meio de comparação das médias das medidas iniciais e finais. Cabe mencionar que todos os testes comportamentais foram realizados antes das sessões de laser, ou seja, demonstrando o efeito da sessão anterior, e descartando a interferência do anestésico nos resultados.

3.7 Ensaio de alodinia tátil

A determinação da alodínia tátil foi avaliada por ensaio quantitativo, em resposta a estímulo tátil aplicado à pata posterior do rato, segundo método descrito por Chaplan (1994), conforme ilustrado na figura 2. Neste teste, os ratos foram colocados, individualmente, em caixas de acrílico com tampa com pequenas aberturas e base aberta. A caixa de acrílico fica sobre uma 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. Para o ensaio de alodínia, foi empregado uma série logarítmica de 10 filamentos de Von Frey (Aesthesiometer Semmes-Weinstein, Stoelting Co., EUA) (Figura 2). 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, 1994).

Figura 2 - Teste de Alodinia – filamentos de *Von Frey*. Ilustração do teste de sensibilidade tátil utilizado para acessar os limiares de alodinia em ratos.

3.8 Ensaio de hiperalgesia térmica

A avaliação da hiperalgesia térmica dos animais foi realizada com o teste plantar térmico, descrito por Hargreaves e colaboradores (Hargreaves et al., 1988) (Figura 3). Este teste utiliza como estímulo o calor induzido por energia radiante do aparato do teste plantar (Ugo Basile, EUA). Os animais foram colocados em caixas de acrílico dispostas sob uma base de vidro. O aparelho que emite a luz é posicionado abaixo da superfície plantar do animal e então se ativa o aparelho, que inicia a incidência de luz e a cronometragem. A sensibilidade ao estímulo térmico foi definida como a latência em segundos da permanência da pata do animal por duas vezes, com intervalos de cinco minutos. Esse feixe foi ajustado a 75% da intensidade máxima de aquecimento com *cutoff* de 20 segundos (para ratos) e o resultado foi representado pela média das duas medidas.

Figura 3 – Teste de *Hargreaves*. Ilustração do teste plantar térmico utilizado para acessar os limiares de hiperalgesia térmica em ratos.

3.9 Ensaio de hiperalgesia mecânica

Para a avaliação da sensibilidade dolorosa dos animais foi utilizado o teste de pressão de pata de ratos (Analgesy-Meter Ugo Basile®, Itália), realizado de acordo com o método descrito por Randall e Sellito (Randall e Selitto, 1957) (Figura 4). Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16 g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso de uma das patas posteriores do rato e interrompida quando o animal apresenta a reação de "retirada" do membro. Neste modelo, o limiar de dor é representado como a força (g) necessária para a indução da reação. Os resultados foram analisados através da comparação das médias das medidas iniciais e finais ou, quando determinado, através da comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

Figura 4 – Teste de pressão da pata por *Randall e Sellito*. Ilustração do teste de pressão da pata utilizado para acessar os limiares de hiperalgesia mecânica em ratos.

3.10 Microscopia eletrônica de transmissão

Para a microscopia eletrônica de transmissão, os animais foram anestesiados via intraperitoneal, com uretano (3g/Kg), perfundidos com a solução fixadora Karnovsky modificada, contendo glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em solução tampão fosfato de sódio a 0,1M e pH= 7,4 de acordo com o método utilizado por Ciena et. al., 2012(Ciena et al., 2012). Após o término dos experimentos comportamentais, o nervo isquiático dos animais foi coletado. As amostras foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% a 4° C e posteriormente imersas em solução aquosa de acetato de uranila 5% em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série crescentes de alcoóis, imersas em óxido de propileno e incluídas em resina Spurr. Cortes semi-finos foram realizados no ultra-micrótomo Reichert Ultra Cut® e corados com a solução de azul de toluidina 1%, para verificação da área a ser analisada. Posteriormente, foram realizados os cortes ultra-finos de 60 nm, coletados em telas de cobre de 200 "mesh" (Sigma®) e contrastados com a solução de acetato de uranila 4% e solução aquosa de citrato de chumbo 0,4% conforme foi relatado por Watanabe e Yamada 1983 (Watanabe e Yamada, 1983). As telas foram examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1010, do Departamento de Anatomia da Universidade de São Paulo.

3.11 Análise de expressão protéica – *western blotting*

Cabe mencionar que inicialmente os animais foram utilizados nos ensaios comportamentais e submetidos ao tratamento com a técnica de laserterapia. Posteriormente, os mesmos foram eutanasiados (por guilhotina) e o nervo isquiático foi coletado para a análise das proteínas de interesse.

Para a extração de proteína total do tecido (nervo isquiático) foi utilizado um tampão de lise (90 mM KCl, 10 mM Hepes, 3 mM $MgCl_2^{2+}$, 5 mM EDTA, glicerol 1%, 1 mM DTT, 0,04% SDS, 20 mM Aprotinina, 20 mM Pepstatina, 20 mM Leupeptatina, 40 μ M PMSF, 100 mM Ortovanadato). A concentração protéica total das proteínas foi obtida pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Em seguida, 15 μ g de proteína total foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (gel de gradiente 4% e 20%) e transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio Rad). Esta foi corada com solução *Ponceau* para avaliar se a concentração de proteínas era similar entre as amostras. Posteriormente a membrana foi incubada com os anticorpos primários conforme descritos na tabela 2 em agitação constante mantido a 4°C overnight. Após sua lavagem, com solução basal (Trisma 1M, NaCl 5M, Tween20), a membrana foi incubada com os anticorpos secundários anti-rabbit (1:5000) e anti-chicken (1:5000) conjugado à peroxidase por 45 minutos a temperatura ambiente. A membrana foi então lavada novamente com solução basal e em seguida submetida ao processo de revelação pelo detector de quimioluminescência (UviTec Gel Doc Systems). As bandas correspondentes à proteína de interesse foram quantificadas por densitometria utilizando o programa Image J, sendo os valores expressos em porcentagem.

Tabela 2 – Lista de anticorpos primários utilizados para a análise de expressão protéica pela técnica de *Western Blotting*.

Proteínas Analisadas	Origem	Peso Molecular	Concentração
LAMININA	SIGMA – ALDRICH (L9393)	200 KDa	1:500
PROTEÍNA ZERO	NOVUSBIO (NB100-1607)	28 KDa	1:500
IL - 6	ABCAM (AB6672)	28KDa	1:500
IL - 10	ABCAM (AB9969)	20KDa	1:500
TNF α	ABCAM (AB9755)	25KDa	1:500
RAGE	ABCAM (AB37647)	42KDa	1:500

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram representados como média $\pm$ e.p.m. A análise estatística foi gerada utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 4.0 (utilizando-se *GraphPad Software Inc.*, CA, EUA) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada usando a análise de variância de uma ou duas vias (*One-way, two-way, ANOVA*), seguidas pelo pós-teste de Tukey . O índice de significância foi considerado de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do modelo de diabetes mellitus tipo 1 induzido por estreptozotocina

Inicialmente testamos três diferentes doses de estreptozotocina (STZ) a fim de escolher aquela que melhor caracterizava a neuropatia diabética. As doses testadas foram 55 mg/kg, 70 mg/kg e 85 mg/kg e observamos os resultados quanto à resposta comportamental (figura 5A) e possíveis alterações glicêmicas. É possível observar, na figura 5 A que o grupo salina, utilizado como controle permaneceu com a resposta comportamental estável ao longo dos dias analisados. Com relação à menor dose utilizada (55 mg/Kg), observamos uma queda na resposta nociceptiva até o sétimo dia após injeção da STZ, retornando a níveis basais a seguir. Porém, quando administramos as doses de 70 e 85 mg/Kg, observamos uma resposta semelhante ao longo do tempo, ou seja, em ambas as doses foram possíveis observar uma queda no limiar nociceptivo. No entanto, na dose de 70 mg/Kg, não observamos alteração glicêmica (entre 96 e 139 mg/dl), dados não apresentados aqui. Já com a dose de 85 mg/Kg, o nível glicêmico variou entre 200 a 600 mg/dl, consequentemente foi a dose escolhida para ser utilizada ao longo do projeto. O resultado do perfil glicêmico pode ser observado na próxima imagem (Figura 6) do tópico 5.2. A seguir, demonstramos na imagem da figura 5 B, a dose de 85mg/Kg no processo nociceptivo representado pelo teste de alodinia tátil. Podemos observar um expressivo decréscimo do limiar nociceptivo nos ratos hiperglicêmicos após quatorze dias da administração da estreptozotocina, se mantendo ao longo do tempo.

Figura 5 - Caracterização do modelo de diabetes mellitus tipo 1 induzido por estreptozotocina.

O limiar de dor, avaliado pelo teste de Von Frey e expresso em gramas, foi determinado antes (tempo zero- MI), 4, 7, 14, 21, 28, 42 e 56 dias após a injeção de STZ ou salina (i.p). Os resultados representam a média $\pm$ epm. * $p < 0.05$ por comparação com grupo controle (salina). N=10 por grupo.

5.2 Efeito da estreptozotocina no perfil glicêmico de ratos

Após a realização da análise descrita anteriormente quanto à dose que melhor caracterizou o quadro nociceptivo, preconizamos a concentração de 85mg/kg para continuidade do modelo de neuropatia diabética periférica proposto.

A administração por via intraperitoneal de estreptozotocina na dose de 85mg/Kg foi capaz de induzir hiperglicemia a partir de vinte e quatro horas após sua administração. A figura abaixo (Figura 6) mostra os valores glicêmicos verificados em três momentos: uma medida inicial, dosagem para obtenção dos valores glicêmicos normais em ratos antes da administração da estreptozotocina; uma medida pós prandial 24 horas após injeção da estreptozotocina e por fim uma nova medida em condição de jejum de 12 horas após 48 horas da administração da estreptozotocina.

Figura 6 – Efeito da hiperglicemia induzida por estreptozotocina no perfil glicêmico de ratos.

Dosagem glicêmica de ratos. *P<0.0001 por comparação entre STZ 85mg/Kg e a medida inicial. N=10 por grupo.

5.3 Efeito da hiperglicemia induzida por estreptozotocina sobre a massa corporal de ratos

Em relação aos efeitos da hiperglicemia induzida pela administração intraperitoneal da estreptozotocina na dose de 85mg/Kg sobre a massa corporal de ratos, foi possível observar significativa perda de massa muscular nos ratos diabéticos a partir de 30 dias após a injeção da estreptozotocina quando comparados com o grupo controle naive (Figura 7). A perda de massa corporal se manteve reduzida ao longo de 60 dias de experimento. No entanto, esta redução de massa corporal não interferiu com os resultados comportamentais ou com a aquisição, pelos animais, de alimento e água ambos de acesso livre em seu ambiente de acomodação.

Figura 7 – Efeito da hiperglicemia induzida por estreptozotocina no peso corporal de ratos ao longo de 60 dias.

Representação gráfica da massa corporal de ratos. * $P < 0.0001$ por comparação entre o grupo diabético não tratado (STZ 85mg/kg) e o grupo controle naive. N=10 por grupo.

5.4 Efeito da técnica de laserterapia sobre as respostas nociceptivas

Para todos os ensaios comportamentais, analisamos o possível efeito do tratamento com a técnica de laserterapia ao longo de 60 dias após a injeção de STZ, única dose de 85 mg/kg. Cabe mencionar que foram realizadas 10 sessões de tratamento e os testes comportamentais foram aplicados sempre um dia após a aplicação de cada sessão do laser.

5.4.1 Efeito do tratamento com laser sobre a resposta tátil

Os resultados demonstram claramente a eficácia da técnica de laserterapia sobre o quadro de alodinia em ratos diabéticos. A figura a seguir (Figura 8) mostra a redução do limiar nociceptivo dos ratos diabéticos antes do tratamento quando comparado com grupo controle (naive) e uma reversão deste quadro após tratamento com a técnica de laserterapia. Este expressivo aumento do limiar nociceptivo no grupo diabético tratado foi observado a partir da quinta sessão e se manteve até a última sessão de laser (décima sessão).

Figura 8 - Caracterização da alodínia tátil induzida pela hiperglicemia e tratamento com a técnica de laserterapia.

Representação gráfica do limiar nociceptivo em ratos. * $P < 0.0001$ por comparação entre o grupo diabético (STZ) não tratado e o grupo controle naive. # $P < 0.0001$ por comparação entre o grupo diabético tratado com laserterapia (STZ+LLLT) e o grupo diabético sem tratamento (STZ). N=10 por grupo.

5.4.2 Efeito do tratamento com laser sobre a resposta ao estímulo térmico

A fim de avaliar a sensibilidade nociceptiva decorrente de um estímulo térmico, foi utilizado o teste de Hargreaves, o qual expressa o limiar nociceptivo dos animais em segundos, como descrito anteriormente (Item 3.8). Os resultados demonstram que a hiperglicemia não foi capaz de induzir qualquer alteração no limiar nociceptivo térmico dos animais diabéticos (STZ) quando comparado ao grupo controle naive. Com relação ao tratamento dos animais com a técnica de laserterapia, também não foi possível observar diferença estatística entre os grupos analisados (Figura 9).

Figura 9 – Caracterização da hiperalgesia térmica e tratamento com a técnica de laserterapia.

Representação gráfica do teste de Hargreaves para a determinação da hiperalgesia térmica. Não foi possível observar diferença estatística entre os grupos analisados. N=5 por grupo.

5.4.3 Efeito do tratamento com laser sobre a resposta ao estímulo mecânico

A fim de avaliar a sensibilidade nociceptiva decorrente de um estímulo mecânico, foi utilizado o teste de pressão de pata, o qual expressa o limiar nociceptivo dos animais em gramas, como descrito anteriormente (Item 3.9). Os resultados demonstram que a hiperglicemia foi capaz de diminuir significativamente o limiar nociceptivo mecânico dos animais diabéticos (STZ) quando comparado ao grupo controle (naive). Com relação ao tratamento dos animais com a técnica de laserterapia, não foi possível observar diferença estatística entre o grupo tratado com a técnica de laserterapia (STZ+LLLT) e o grupo experimental diabético (STZ) (Figura 10).

FIGURA 10 – Caracterização da hiperalgesia mecânica induzida pela hiperglicemia e tratamento com a técnica de laserterapia.

Representação gráfica do teste de Randall e Sellito para a determinação da hiperalgesia mecânica. * $P < 0.001$ em comparação com o grupo diabético não tratado (STZ) e o grupo controle naive. $N = 10$ por grupo.

5.5 Efeito do laser nas fibras nervosas periféricas

Visto o efeito benéfico do tratamento com a técnica de laserterapia em reverter o quadro nociceptivo (alodinia tátil), foi de grande interesse observar se o referido protocolo de tratamento seria capaz de induzir alguma alteração no processo degenerativo de fibras nervosas periféricas presente em modelos de diabetes *mellitus* tipo 1. A imagem a seguir (figura 11) mostra a morfologia das fibras nervosas periféricas do nervo isquiático dos grupos controle naive 60 dias, grupo experimental diabético (STZ) 60 dias e grupo experimental diabético tratado com laserterapia (STZ+LLLT).

Não foram observadas alterações morfológicas nas fibras nervosas do grupo controle naive 60 dias (Figura 11 A). Já após 60 dias da administração da estreptozotocina, é possível observar alterações estruturais nas fibras quanto à morfologia da bainha de mielina (seta,

figura 11B) e ainda evidencia-se uma provável redução no número (distribuição) de fibras amielínicas quando comparado com o grupo controle naive.

Após as 10 sessões com a técnica de laserterapia, é possível observar claramente a morfologia de aspecto regular da bainha de mielina das fibras mielínicas assim como uma provável recuperação (ou proteção quanto à perda) de fibras amielínicas (asterisco) no grupo diabético tratado (Figura 11 C, STZ+LLLT).

FIGURA 11 – Nervo isquiático observado em corte transversal por microscopia eletrônica de transmissão.

FIGURA 11. A: NAIVE 60 DIAS

FIGURA 11.B: STZ 60 DIAS

FIGURA 11. C: STZ+LLLT

Nervo isquiático em corte transversal observado por microscopia eletrônica de transmissão. Asteriscos: fibras amielínicas. Setas: bainha de mielina.

5.5.1 Efeito da técnica de laserterapia na regeneração de fibras nervosas periféricas – avaliação das proteínas estruturais: laminina e proteína zero (P0).

A fim de corroborar com os resultados acima explicitados quanto aos efeitos da laserterapia sobre as fibras nervosas periféricas, foi avaliado a participação das proteínas estruturais laminina (Figura 12 A) e proteína zero (Figura 12 B) no processo de reparo das fibras do nervo isquiático dos animais.

O nervo isquiático dos animais foi retirado após a última sessão de laser (décima) e analisados por meio da técnica de *Western Blotting*. Com relação à análise da laminina, nossos resultados demonstram uma expressão basal desta proteína nos animais controles, naive e salina e uma diminuição no grupo com diabetes (STZ). Após o tratamento, observamos uma reversão da expressão desta proteína, voltando a níveis basais (Figura 12 A). Com relação à expressão da proteína zero, observamos também, uma expressão basal nos grupos controles, no entanto após a injeção da STZ, observamos uma leve queda, porém sem diferença estatística. Após o tratamento com laser, observamos um aumento da expressão

desta proteína. Cabe mencionar que não foi possível observar diferença entre o tratado e os grupos controles, apenas entre o tratado e doente (STZ) (figura 12 B).

FIGURA 12 - Efeito da técnica de laserterapia sobre a expressão das proteínas estruturais laminina e proteína zero (P0).

A - * $P < 0.05$ por comparação entre o grupo diabético tratado com a técnica de laserterapia (STZ+LLLT) e o grupo diabético não tratado (STZ). # $P < 0.05$ em comparação com os grupos controles salina e naive. B – * $P < 0.05$ por comparação entre o grupo diabético tratado com a técnica de laserterapia (STZ+LLLT) e o grupo diabético não tratado (STZ). N=5 por grupo.

5.6 Efeito da técnica de laserterapia sobre o receptor RAGE

A fim de avaliar a participação do receptor para os produtos finais de glicação avançada (RAGE) no presente modelo de neuropatia diabética periférica, foi analisada a expressão protéica desse receptor no nervo isquiático dos animais.

Os resultados mostram claramente a expressiva participação deste receptor no grupo diabético (STZ) quando comparado com o grupo controle naive. Em relação ao tratamento com a técnica de laserterapia, foi possível observar uma significativa redução da expressão deste receptor no grupo diabético tratado com a técnica (STZ+LLLT) (Figura 13).

Figura 13 – Efeito da técnica de laserterapia sobre o receptor para os produtos finais de glicação avançada (RAGE).

Expressão protéica do receptor para os produtos finais da glicação avançada (RAGE) no nervo isquiático de ratos por *Western Blotting*. ^{**}P<0.05 em comparação com o grupo diabético não tratado (STZ). [#]P<0.05 em comparação com o grupo controle naive. N=5 por grupo.

5.7 Efeito da técnica de laserterapia sobre a expressão de citocinas (interleucinas) pró (TNF α , IL-6) e antiinflamatória (IL-10) no nervo isquiático de ratos

Com o intuito de avaliar a participação de citocinas pró e antiinflamatórias no modelo de neuropatia diabética periférica, foi realizada a quantificação por *Western Blotting* de citocinas (interleucinas) no nervo isquiático dos animais, a fim de selecionar quais das citocinas propostas estariam agindo de forma mais relevante no processo nociceptivo no referido modelo. Inicialmente propusemos quantificar as citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 no nervo isquiático dos animais.

Em relação à quantificação da interleucina IL-6 no nervo isquiático dos animais, não foi possível observar diferença estatística em nenhum dos grupos analisados (Figura 14 A). Em contrapartida, a citocina pró-inflamatória TNF α , demonstrou estar mais presente no nervo isquiático dos animais diabéticos (STZ) do que no grupo de animais controle naive. Ainda, em relação a esta mesma citocina, não foi possível observar diferença estatística no grupo diabético tratado com a técnica de laserterapia (STZ+LLLT) e o grupo experimental diabético (STZ) (Figura 14 B).

Com relação à análise da interleucina antiinflamatória, IL-10, no nervo isquiático dos animais, nossos resultados demonstraram uma diminuição desta interleucina no animal diabético e um retorno aos níveis basais após o tratamento com a técnica de laserterapia (STZ+LLLT) (Figura 14 C).

FIGURA 14 – Efeito da técnica de laserterapia sobre a expressão das citocinas (interleucinas) pró (TNF α , IL-6 A, B respectivamente) e antiinflamatória (IL-10 C) no nervo isquiático de ratos.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como principal finalidade a investigação da participação da técnica de laserterapia na neuropatia diabética periférica de ratos no modelo de diabetes *mellitus* tipo 1 induzido por estreptozotocina. A fim de avaliar possíveis alterações na resposta nociceptiva causada pela hiperglicemia, foram realizados ensaios comportamentais para a análise do limiar nociceptivo assim como, análise morfológica do nervo isquiático dos animais que tiveram a indução do diabetes *mellitus* tipo 1 após injeção do agente. O intuito do estudo foi analisar a provável participação das citocinas (interleucinas) pró (TNF α , IL-6) e antiinflamatória (IL-10) no contexto de geração de dor e reversão da mesma após o tratamento proposto no presente modelo. A estreptozotocina é um antibiótico que pode causar destruição das células β pancreáticas e é amplamente utilizado como agente diabetogênico em modelo animal de diabetes mellitus insulino-dependente ou diabetes *mellitus* tipo 1 (Wu e Huan, 2008). O tempo escolhido para a análise do nervo isquiático e para os testes comportamentais (60 dias após a injeção da STZ) foi determinado a partir de um estudo previamente realizado e publicado pelo nosso grupo que demonstrou significativa alteração morfológica nas fibras nervosas periféricas dos ratos hiperglicêmicos assim como alterações no limiar nociceptivo destes mesmos ratos (Rocha et al., 2017).

A neuropatia diabética é uma das complicações crônicas mais comuns e debilitantes do diabetes *mellitus* e atinge cerca de 50% daqueles acometido pela doença (Amorim et al., 2017). Além disso, a dor sofrida por aqueles indivíduos portadores da neuropatia diabética é descrita como progressiva e crônica e caracterizada por sensação de formigamento, queimação, choque elétrico, dor em punhalada e ainda sensação de hiperestesia (Amorim et al., 2017). Já é sabido que alterações metabólicas e disfunção vascular são fatores chaves na neuropatia diabética, porém, os mecanismos fisiopatológicos que determinam e constroem a neuropatia diabética ainda estão bem longe de serem elucidados.

O déficit de óxido nítrico e o aumento na atividade das espécies reativas de oxigênio decorrente do estado hiperglicêmico são fatores predominantes para o dano vascular que conseqüentemente leva as fibras nervosas ao estado de hipóxia resultando na degeneração de tais fibras (Zychowska et al., 2013). Ainda, quando se trata das fibras mielínicas, a hiperglicemia promove expressivo estresse osmótico nas células de Schwann (células produtoras de bainha de mielina nas fibras nervosas periféricas) devido ao aumento na produção de sorbitol. Uma vez que este composto não atravessa a membrana celular, sua

concentração intracelular aumenta ocasionando desta forma danos estruturais irreversíveis a tais células (Zychowska et al., 2013). São muitos os fatores que contribuem expressivamente para o dano do tecido nervoso decorrentes do diabetes *mellitus*, porém, há ainda grandes questionamentos e dúvidas a serem esclarecidos quando se trata de justificar o porquê a dor crônica acomete os indivíduos portadores de tal doença.

Recentemente, fortes evidências demonstram que a participação de metabólitos altamente reativos derivados da condição hiperglicêmica apresenta significativa participação no processo álgico no quadro de neuropatia diabética e não apenas nos processos de degeneração periférica por si só. Dentre estes metabólitos, o metilglioxal tem efetiva contribuição na geração e manutenção do processo de dor. Este por sua vez, é conhecido pela modificação pós-translacional de canais de sódio específicos do nociceptor e também por estar associado ao aumento da excitabilidade e hiperalgesia de neurônios sensoriais (Bierhaus et al., 2012). Ainda, o metilglioxal está provavelmente envolvido no retardo da condução de impulsos nervosos nas fibras mielínicas e também contribui com a inativação lenta do canal de sódio Nav1.7 (Bierhaus et al., 2012).

Como se pode observar, a neuropatia diabética decorre de uma complexidade diversa de desordens metabólicas que levam os indivíduos a uma vida repleta de complicações. É justamente devido ao fato de ser uma doença metabólica que até o presente momento não se encontram fármacos que se destinem exclusivamente ao seu tratamento e / ou prevenção. Somando-se a isso podemos mencionar que mesmo com o controle glicêmico o indivíduo portador do diabetes *mellitus* tem altas chances de desenvolver a neuropatia diabética periférica.

O presente projeto mostrou a eficácia do uso da técnica de laserterapia para a melhora da dor e também como uma importante ferramenta para prevenir ou reparar o dano ocasionado às fibras nervosas periféricas decorrentes do diabetes.

Com relação aos resultados aqui apresentados, obteve-se êxito quanto à padronização da dose de estreptozotocina (85mg/Kg) para a indução do diabetes *mellitus* tipo 1, assim sendo, foi possível a realização do estudo da neuropatia diabética periférica uma vez que a dosagem do fármaco escolhido mimetizou significativamente o quadro hiperglicêmico apresentado por aqueles portadores do diabetes *mellitus* tipo 1.

Curiosamente, não foi possível observar alterações significativas quanto aos resultados referentes à hiperalgesia térmica (teste de Hargreaves) nos ratos diabéticos, assim como nos ratos diabéticos submetidos ao protocolo de tratamento quando comparados com os animais do grupo controle naïve. Em contrapartida, estudos realizados por outros pesquisadores

observaram um efeito positivo na resposta ao estímulo térmico. No entanto, estes autores utilizaram outros modelos experimentais que acessam o limiar nociceptivo em relação ao estímulo térmico, como por exemplo, a técnica de placa quente (Alshahrani et al., 2012) ou ainda no teste de imersão da cauda (Mirshekar et al., 2010). Provavelmente esta diferença na escolha do ensaio comportamental justifica esta diferença no padrão de resposta entre o nosso trabalho e os dois citados acima.

Com relação à análise dos dados referentes à hiperalgesia mecânica, os resultados mostraram um expressivo decréscimo do limiar nociceptivo dos ratos diabéticos quando comparados com os animais do grupo controle naive. Porém, interessante, a técnica de tratamento proposto que foi significativamente eficaz na reversão do quadro de alodinia, não foi satisfatória em interferir com a resposta ao estímulo mecânico, sugerindo-se desta forma que provavelmente sejam necessários outros parâmetros referentes à técnica de laserterapia para ser alcançado o estímulo mecânico. Cabe mencionar, que já é bem relatado na literatura que diferentes parâmetros como; comprimento de onda, irradiação, tempo de tratamento, pulsado ou contínuo, pode ser escolhido para diversas modalidades de tratamento e nos levam a diferentes resultados (Hashmi et al., 2010).

Ainda, quanto à análise dos dados referentes à reversão do quadro algico, nossos dados corroboram com a literatura ao mostrar o potente efeito analgésico da laserterapia em diversos modelos de dor, a exemplo, podemos citar estudos realizados por Chen YJ et. al., (2014), onde os pesquisadores realizaram o esmagamento do gânglio da raiz dorsal de ratos e observaram que após os animais serem tratados com laserterapia, estes apresentaram melhora do quadro hiperalgésico e ainda expressiva atividade de reparo do tecido nervoso lesado. Em estudos de dor neuropática crônica também desenvolvida em modelo animal, nosso grupo mostrou pela técnica de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) que a laserterapia foi eficaz na redução da hiperalgesia térmica e mecânica desde a segunda sessão (Oliveira et al., 2017).

Em relação ao possível efeito do tratamento sobre as citocinas, nossos resultados mostraram que o TNF α está expressivamente mais presente no nervo isquiático dos ratos diabéticos quando comparados com o grupo controle. Em contrapartida, não observamos nenhuma alteração quando avaliamos a interleucina IL-6 em nenhum dos grupos analisados. Ambos, TNF α e IL-6 são importantes citocinas pró-inflamatórias que desempenham papel central na geração e manutenção do processo nociceptivo decorrente de dano ao tecido nervoso (Zhang e An, 2007). Na literatura é descrita a observação e a correlação da

interleucina IL-6 presente no soro sanguíneo de humanos com o dano causado as fibras nervosas na neuropatia diabética periférica (Magrinelli et al., 2015).

Por outro lado, quando se refere à análise da interleucina antiinflamatória IL-10, os resultados mostram expressivo aumento da densidade óptica nos níveis desta interleucina no nervo isquiático dos ratos diabéticos tratados com a técnica de laserterapia. Sugerindo-se desta forma, que a possível melhora do quadro nociceptivo caracterizado por alodinia seja, pelo menos em parte, à participação desta interleucina no controle da dor. Dentre uma vasta classe de citocinas antiinflamatórias, a interleucina IL-10 é a que apresenta considerável papel na repressão da expressão de citocinas com atividade pró-inflamatórias, como por exemplo, TNF α , IL-6 e IL-1 (Zhang e An, 2007).

Outro fato importante a ser destacado quanto aos resultados, foi a análise da expressão protéica do receptor para os produtos finais de glicação avançada (RAGE) no nervo isquiático dos animais. O RAGE é um tipo de receptor que está presente tanto em células neuronais como não neuronais como, por exemplo, monócitos e macrófagos e que atua na liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF α) ao redor de tais fibras, contribuindo para a geração e manutenção do processo doloroso (Brederson, 2015). Nossos resultados mostraram que de fato o receptor em questão está mais expresso no nervo isquiático do grupo diabético, e que após tratamento com a técnica de laserterapia a densidade óptica para este receptor está expressivamente reduzida. Sugerindo-se desta forma, uma possível relação entre o quadro nociceptivo dos animais diabéticos e o de melhora deste quadro quando comparado com o grupo tratado com a técnica de laserterapia, evidenciado pelo aumento dos níveis de IL-10 e consequente redução destes receptores também no grupo tratado.

Com relação as proteínas estruturais, nossos resultados apontam para um aumento da expressão de proteína zero e laminina após o tratamento com laser. As células de Schwann envolvem os axônios que pertencem à divisão periférica do sistema nervoso com a finalidade de formar a bainha de mielina e participar na regeneração axônica. Assim, células de Schwann desempenham um papel importante na regeneração do sistema nervoso periférico. A regeneração ocorre devido a essas células sintetizarem uma série de moléculas que favorecem o crescimento das fibras nervosas. Estas moléculas são: fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e outros fatores de crescimento associado à matriz extracelular, especialmente na lamina basal (Chavez, 1997).

A bainha de mielina, camada de isolamento feita por envolvimento extenso dos axônios através da membrana plasmática, é dependente da presença de moléculas altamente adesivas que mantêm membrana basal bem aderida ao axônio. A glicoproteína (proteína zero

– P0) é o principal componente do sistema nervoso periférico responsável pela formação da bainha de mielina dos mamíferos (Rotenstein et al., 2008). Diversos estudos apontam mutações na proteína zero a qual está associada mielopatia periférica (Briani et al., 2008; Jang e Svaren, 2009). Em relação ao emprego da técnica de laserterapia na regeneração de nervos periféricos, estudos realizados em ratos submetidos à aplicação do laser após ressecção completa do nervo isquiático, e submetidos à técnica 24 horas após a lesão demonstraram o crescimento neuronal, por meio de histologia. Foi também observada uma melhora na locomoção dos animais por meio do teste de Índice Funcional do Isquiático, constatando-se assim o poder benéfico da laserterapia para a regeneração de nervos periféricos (Medalha et al., 2012). Ainda, trabalhos realizados pelo nosso grupo demonstraram que após lesão do nervo alveolar inferior com posterior tratamento com laser, houve aumento do NGF quando comparado com o grupo não tratado, evidenciando mais uma vez a eficácia da laserterapia para a reparação dos nervos periféricos (de Oliveira Martins et al., 2013).

Com relação à análise morfológica do nervo isquiático dos animais diabéticos apresentada no presente estudo, foi possível observar relevante quadro de degeneração de fibras nervosas periféricas evidenciado pelo aspecto estrutural irregular da bainha de mielina das fibras mielinizadas assim como, pela notória observação da redução do número de fibras amielínicas. Por outro lado, os ratos diabéticos submetidos ao tratamento com as dez sessões de laserterapia mostraram satisfatoriamente que o laser ao ser aplicado para tratar as fibras nervosas periféricas já danificadas pela hiperglicemia foi capaz de participar ativamente do processo regenerativo de tais fibras assim como pode ter exercido participação na recuperação de fibras amielínicas.

Nossos dados corroboram com estudos realizados por Martins DO et al., (2017) que mostraram que os ratos que tiveram o nervo alveolar inferior esmagado recuperaram a morfologia original de suas fibras logo após serem submetidos ao tratamento com laserterapia, tais resultados foram obtidos ao analisar a expressão protéica de laminina e proteína zero.

Durante o desenvolvimento do presente projeto de pesquisa, de maneira geral, foi possível observar que o tratamento com a técnica laserterapia foi responsável por reverter o quadro nociceptivo dos animais diabéticos caracterizado pela alodinia (estímulo tátil) e ainda este mesmo protocolo de tratamento foi capaz de modular proteínas estruturais (laminina e proteína zero) nas fibras nervosas do nervo periférico. Ainda, a técnica de laserterapia foi capaz também de modular a expressão de uma importante interleucina antiinflamatória (IL-

10) no nervo isquiático dos ratos diabéticos submetidos ao tratamento com a técnica de laserterapia.

Cabe ressaltar que apesar das diferenças entre os modelos para o estudo da dor ou nocicepção acima citados, os efeitos da laserterapia são semelhantes e tem por objetivo central a melhora da dor crônica e ou aguda, e a restauração do tecido nervoso lesado. Cabe ainda lembrar que os benéficos efeitos da laserterapia não se restringem a apenas modelos animais e sim, já se observa na literatura trabalhos experimentais com seres humanos mostrando efeitos bastante expressivos. Bjordal e colaboradores demonstraram que ao irradiar laser na cápsula articular (joelho) de pacientes com dor articular crônica, reduz significativamente a dor e consequentemente resulta em uma melhor qualidade de vida destes pacientes (Bjordal et al., 2003).

Há ainda um desafiador trabalho a ser feito quando se fala em compreender os mecanismos de como a laserterapia atua em doenças metabólicas como o próprio diabetes *mellitus*. É necessária uma continuada investigação a nível molecular destas duas potências tão distintas e enigmáticas. De um lado a laserterapia com seus efeitos ímpares quanto à restauração do metabolismo e, do outro, o diabetes *mellitus* que há mais de 3500 anos vem intrigando os pesquisadores quanto à sua capacidade de danificar o metabolismo em diversos aspectos.

7 CONCLUSÃO

Em síntese, o tratamento com a técnica de laserterapia foi capaz de reverter o quadro de nocicepção caracterizado por alodinia induzida pela neuropatia diabética periférica em modelo animal de diabetes *mellitus* tipo 1. O protocolo proposto além de reverter o quadro nociceptivo foi também capaz de regenerar as fibras nervosas periféricas no nervo isquiático que ficou expressivamente evidenciado por meio da modulação de proteínas estruturais relacionadas ao processo de reparo no tecido nervoso (laminina/proteína zero) e confirmada pela análise morfológica do nervo isquiático por microscopia eletrônica de transmissão. Ainda, este mesmo protocolo de tratamento foi capaz de modular também importantes citocinas pró e antiinflamatórias no nervo periférico dos animais em estudo. Interessantemente, a técnica de laserterapia foi capaz de modular o receptor para os produtos finais de glicação avançada (RAGE) de forma satisfatória nos animais diabéticos.

O presente estudo apresenta um protocolo de tratamento (laserterapia) que demonstrou ser eficiente para este quadro de complicação crônica e que certamente poderá auxiliar na prática clínica durante o tratamento daqueles acometidos por tal doença. Porém cabe ressaltar que muito se precisa investigar sobre as ações da laserterapia no tecido nervoso e, sobretudo elucidar da melhor forma possível quais os mecanismos de ação medeiam os efeitos benéficos da técnica de laserterapia.

REFERÊNCIAS*

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2017 Out 10]. Available from:

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

ALBREKTSSON T, HANSSON HA. AN ULTRASTRUCTURAL CHARACTERIZATION OF THE INTERFACE BETWEEN BONE AND SPUTTERED TITANIUM OR STAINLESS STEEL SURFACES. *BIOMATERIALS*. 1986; 7(3): 201-5.

ALSHAHRANI S, FERNANDEZ-CONTI F, ARAUJO A, DiFulvio M. RAPID DETERMINATION OF THE THERMAL NOCICEPTIVE THRESHOLD IN DIABETIC RATS. *J Vis Exp*. 2012; (63): e3785.

AMORIM D, PUGA S, BRAGANCA R, BRAGA A, PERTOVAARA A, ALMEIDA A, PINTO-RIBEIRO F. MINOCYCLINE REDUCES MECHANICAL ALLODYNIA AND DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIOUR IN TYPE-1 DIABETES MELLITUS IN THE RAT. *BEHAV BRAIN RES*. 2017.

AMORIM JC, DE SOUSA GR, DE BARROS SILVEIRA L, PRATES RA, PINOTTI M, RIBEIRO MS. CLINICAL STUDY OF THE GINGIVA HEALING AFTER GINGIVECTOMY AND LOW-LEVEL LASER THERAPY. *PHOTOMED LASER SURG*. 2006; 24(5): 588-94.

ATLAS ID. INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION IN: [ONLINE]. 2013. DISPONÍVEL EM

<http://www.idf.org/diabetesatlas>

BIERHAUS A, FLEMING T, STOYANOV S, LEFFLER A, BABES A, NEACSU C, SAUER SK, EBERHARDT M, SCHNOLZER M, LASITSCHKA F, NEUHUBER WL, KICHKO TI, KONRADE I, ELVERT R, MIER W, PIRAGS V, LUKIC IK, MORCOS M, DEHMER T, RABBANI N, THORNALLEY PJ, EDELSTEIN D, NAU C, FORBES J, HUMPERT PM, SCHWANINGER M, ZIEGLER D, STERN DM, COOPER ME, HABERKORN U, BROWNLEE M, REEH PW, NAWROTH PP. METHYLGLYOXAL MODIFICATION OF NAV1.8 FACILITATES NOCICEPTIVE NEURON FIRING AND CAUSES HYPERALGESIA IN DIABETIC NEUROPATHY. *NAT MED*. 2012; 18(6): 926-33.

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.

BREDERSON J-D, STRAKHOVA, M., MILLS, C., BARLOW, E., MEYER, A., NIMMRICH, V., LEDDY, M., SIMLER, G., SCHMIDT, M., JARVIS, M. AND LACY, S. A MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST THE RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS ATTENUATES INFLAMMATORY AND NEUROPATHIC PAIN IN THE MOUSE. *EUROPEAN JOURNAL OF PAIN*. 2015.

BREDERSON JD, STRAKHOVA M, MILLS C, BARLOW E, MEYER A, NIMMRICH V, LEDDY M, SIMLER G, SCHMIDT M, JARVIS M, LACY S. A MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST THE RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS ATTENUATES INFLAMMATORY AND NEUROPATHIC PAIN IN THE MOUSE. *EUR J PAIN*. 2016; 20(4): 607-14.

BRIANI C, ADAMI F, CAVALLARO T, TAIOLI F, FERRARI S, FABRIZI G. AXONAL NEUROPATHY DUE TO MYELIN PROTEIN ZERO MUTATION MISDIAGNOSED AS AMYLOID NEUROPATHY. *MUSCLE NERVE*. 2008; 38(1): 921-3.

BROWNLEE M. BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR CELL BIOLOGY OF DIABETIC COMPLICATIONS. *NATURE*. 2001; 414(6865): 813-20.

CHAPLAN SR, BACH, F.W., POGREL, J.W., CHUNG, J.M. & YAKSH, T.L. . QUANTITATIVE ASSESSMENT OF TACTILE ALLODYNIA IN THE RAT PAW. *J. NEUROSCI. METHODS*. 1994; 53: 55-63.

CHAVEZ DC. EFECTOS DE LA CÉLULAS DE SHWANN EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDO NERVIOSO / EFFECTS OF THE SCHWANN CELLS IN THE NERVE TISSUE REGENERATION. *REV. CIENT. (BOGOTÁ)*. 1997; 1: 65-8.

- CIENA AP, DE ALMEIDA SR, DIAS FJ, BOLINA CDE S, ISSA JP, IYOMASA MM, OGAWA K, WATANABE IS. FINE STRUCTURE OF MYOTENDINOUS JUNCTION BETWEEN THE ANTERIOR BELLY OF THE DIGASTRIC MUSCLE AND INTERMEDIATE TENDON IN ADULTS RATS. *MICRON*. 2012; 43(2-3): 258-62.
- DA RE GUERRA F, VIEIRA CP, OLIVEIRA LP, MARQUES PP, DOS SANTOS ALMEIDA M, PIMENTEL ER. LOW-LEVEL LASER THERAPY MODULATES PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES AFTER PARTIAL TENOTOMY. *LASERS MED SCI*. 2016; 31(4): 759-66.
- 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.
- GAL P, MOKRY M, VIDINSKY B, KILIK R, DEPTA F, HARAKALOVA M, LONGAUER F, MOZES S, SABO J. EFFECT OF EQUAL DAILY DOSES ACHIEVED BY DIFFERENT POWER DENSITIES OF LOW-LEVEL LASER THERAPY AT 635 NM ON OPEN SKIN WOUND HEALING IN NORMAL AND CORTICOSTEROID-TREATED RATS. *LASERS MED SCI*. 2009; 24(4): 539-47.
- 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.
- HARRIS MI. CLASSIFICATION AND DIAGNOSTIC CRITERIA FOR DIABETES MELLITUS AND OTHER CATEGORIES OF GLUCOSE INTOLERANCE. *PRIM CARE*. 1988; 15(2): 205-25.
- HASHMI JT, HUANG YY, OSMANI BZ, SHARMA SK, NAESER MA, HAMBLIN MR. ROLE OF LOW-LEVEL LASER THERAPY IN NEUROREHABILITATION. *PM R*. 2010; 2(12 SUPPL 2): S292-305.
- JANG SW, SVAREN J. INDUCTION OF MYELIN PROTEIN ZERO BY EARLY GROWTH RESPONSE 2 THROUGH UPSTREAM AND INTRAGENIC ELEMENTS. *J BIOL CHEM*. 2009; 284(30): 20111-20.
- JURANEK J, RAY R, BANACH M, RAI V. RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION END-PRODUCTS IN NEURODEGENERATIVE DISEASES. *REV NEUROSCI*. 2015; 26(6): 691-8.
- KARU T. PRIMARY AND SECONDARY MECHANISMS OF ACTION OF VISIBLE TO NEAR-IR RADIATION ON CELLS. *J PHOTOCHEM PHOTOBIOLOG B*. 1999; 49(1): 1-17.
- KREISLER M, CHRISTOFFERS AB, AL-HAJ H, WILLERSHAUSEN B, D'HOEDT B. LOW LEVEL 809-NM DIODE LASER-INDUCED IN VITRO STIMULATION OF THE PROLIFERATION OF HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS. *LASERS SURG MED*. 2002; 30(5): 365-9.
- L-AL AC. BENEFICIAL EFFECTS OF LASER THERAPY IN THE EARLY STAGES OF RHEUMATOID ARTHRITIS ONSET. *LASER THER*. 1999: 79-87.
- LI J, SCHMIDT AM. CHARACTERIZATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE PROMOTER OF RAGE, THE RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS. *J BIOL CHEM*. 1997; 272(26): 16498-506.
- MAGRINELLI F, BRIANI C, ROMANO M, RUGGERO S, TOFFANIN E, TRIOLO G, PETER GC, PRAITANO M, LAURIOLA MF, ZANETTE G, TAMBURIN S. THE ASSOCIATION BETWEEN SERUM CYTOKINES AND DAMAGE TO LARGE AND SMALL NERVE FIBERS IN DIABETIC PERIPHERAL NEUROPATHY. *J DIABETES RES*. 2015; 2015: 547834.
- 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.
- MILORO M, HALKIAS LE, MALLERY S, TRAVERS S, RASHID RG. LOW-LEVEL LASER EFFECT ON NEURAL REGENERATION IN GORE-TEX TUBES. *ORAL SURG ORAL MED ORAL PATHOL ORAL RADIOLOG ENDOD*. 2002; 93(1): 27-34.

MIRSHEKAR M, ROGHANI M, KHALILI M, BALUCHNEJADMOJARAD T, ARAB MOAZZEN S. CHRONIC ORAL PELARGONIDIN ALLEVIATES STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC NEUROPATHIC HYPERALGESIA IN RAT: INVOLVEMENT OF OXIDATIVE STRESS. *IRAN BIOMED J*. 2010; 14(1-2): 33-9.

NASCIMENTO PM. EFEITO DA VARIAÇÃO DA INTENSIDADE E DO COMPRIMENTO DE ONDA DO LASER NÃO CIRÚRGICO EM FERIDAS CIRÚRGICAS EM DORSO DE RATOS: ESTUDO HISTOLÓGICO SÃO JOSÉ DOS CAMPOS: UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA; 2001.

OHSHIRO T, CALDERHEAD RG. DEVELOPMENT OF LOW REACTIVE-LEVEL LASER THERAPY AND ITS PRESENT STATUS. *J CLIN LASER MED SURG*. 1991; 9(4): 267-75.

OLIVEIRA ME, SANTOS FM, BONIFACIO RP, FREITAS MF, MARTINS DO, CHACUR M. LOW LEVEL LASER THERAPY ALTERS SATELLITE GLIAL CELL EXPRESSION AND REVERSES NOCICEPTIVE BEHAVIOR IN RATS WITH NEUROPATHIC PAIN. *PHOTOCHEM PHOTOBIOLOG SCI*. 2017.

ORTIZ MCSM-R, S. M.; SOARES, E. G.; PARIZOTTO, N. A.; . INFLUENCIA DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NOS NÍVEIS DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE COELHOS. *REVISTA BRASILEIRA DE FISIOTERAPIA*. 2001; 7(3): 187-94.

PASSARELLA S. HE-NE LASER IRRADIATION OF ISOLATED MITOCHONDRIA. *J PHOTOCHEM PHOTOBIOLOG B*. 1989; 3(4): 642-3.

RANDALL LO, SELITTO JJ. A METHOD FOR MEASUREMENT OF ANALGESIC ACTIVITY ON INFLAMED TISSUE. *ARCH INT PHARMACODYN THER*. 1957; 111(4): 409-19.

RIBEIRO MSZ, D. M. LASER EM BAIXA INTENSIDADE. *A ODONTOLOGIA E O LASER*; 2004. p. 217.

ROCHA IR, CIENA AP, ROSA AS, MARTINS DO, CHACUR M. PHOTOBIOSTIMULATION REVERSES ALLODYNIA AND PERIPHERAL NERVE DAMAGE IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED TYPE 1 DIABETES. *LASERS MED SCI*. 2017; 32(3): 495-501.

ROCHKIND S, DRORY V, ALON M, NISSAN M, OUAKNINE GE. LASER PHOTOTHERAPY (780 NM), A NEW MODALITY IN TREATMENT OF LONG-TERM INCOMPLETE PERIPHERAL NERVE INJURY: A RANDOMIZED DOUBLE-BLIND PLACEBO-CONTROLLED STUDY. *PHOTOMED LASER SURG*. 2007; 25(5): 436-42.

ROCHKIND S, NISSAN M, ALON M, SHAMIR M, SALAME K. EFFECTS OF LASER IRRADIATION ON THE SPINAL CORD FOR THE REGENERATION OF CRUSHED PERIPHERAL NERVE IN RATS. *LASERS SURG MED*. 2001; 28(3): 216-9.

ROTENSTEIN L, HERATH K, GOULD RM, DE BELLARD ME. CHARACTERIZATION OF THE SHARK MYELIN PO PROTEIN. *BRAIN BEHAV EVOL*. 2008; 72(1): 48-58.

SCHMIDT AM, YAN SD, YAN SF, STERN DM. THE MULTILIGAND RECEPTOR RAGE AS A PROGRESSION FACTOR AMPLIFYING IMMUNE AND INFLAMMATORY RESPONSES. *J CLIN INVEST*. 2001; 108(7): 949-55.

SHAMIR MH, ROCHKIND S, SANDBANK J, ALON M. DOUBLE-BLIND RANDOMIZED STUDY EVALUATING REGENERATION OF THE RAT TRANSECTED SCIATIC NERVE AFTER SUTURING AND POSTOPERATIVE LOW-POWER LASER TREATMENT. *J RECONSTR MICROSURG*. 2001; 17(2): 133-7; DISCUSSION 8.

SINGH VP, BALI A, SINGH N, JAGGI AS. ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS AND DIABETIC COMPLICATIONS. *KOREAN J PHYSIOL PHARMACOL*. 2014; 18(1): 1-14.

SOMMER C, KRESS M. RECENT FINDINGS ON HOW PROINFLAMMATORY CYTOKINES CAUSE PAIN: PERIPHERAL MECHANISMS IN INFLAMMATORY AND NEUROPATHIC HYPERALGESIA. *NEUROSCI LETT*. 2004; 361(1-3): 184-7.

SPECTRUM D. FROM THEBES TO TORONTO AND THE 21ST CENTURY: AN INCREDIBLE JOURNEY IN 2002.

SUNAHARA KK, NUNES FP, BAPTISTA MA, STRELL C, SANNOMIYA P, WESTERBERG LS, MARTINS JO. INSULIN INFLUENCES AUTOPHAGY RESPONSE DISTINCTIVELY IN MACROPHAGES OF DIFFERENT COMPARTMENTS. *CELL PHYSIOL BIOCHEM*. 2014; 34(6): 2017-26.

TUNER J, HODE L. IT'S ALL IN THE PARAMETERS: A CRITICAL ANALYSIS OF SOME WELL-KNOWN NEGATIVE STUDIES ON LOW-LEVEL LASER THERAPY. *J CLIN LASER MED SURG*. 1998; 16(5): 245-8.

WALKER J. RELIEF FROM CHRONIC PAIN BY LOW POWER LASER IRRADIATION. *NEUROSCI LETT*. 1983; 43(2-3): 339-44.

WATANABE I, YAMADA E. THE FINE STRUCTURE OF LAMELLATED NERVE ENDINGS FOUND IN THE RAT GINGIVA. *ARCH HISTOL JPN*. 1983; 46(2): 173-82.

WU KK, HUAN Y. STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC MODELS IN MICE AND RATS. *CURR PROTOC PHARMACOL*. 2008; CHAPTER 5: UNIT 5 47.

YAGIHASHI S, MIZUKAMI H, SUGIMOTO K. MECHANISM OF DIABETIC NEUROPATHY: WHERE ARE WE NOW AND WHERE TO GO? *J DIABETES INVESTIG*. 2011; 2(1): 18-32.

YAMAMOTO HOA, IGUCHI N, KINOSHITA S. ANTINOCICEPTIVE EFFECTS OF LASER IRRADIATION OF HOKU POINT IN RATS. *PAIN CLINICAL*. 1988.

ZENKER J, ZIEGLER D, CHRAST R. NOVEL PATHOGENIC PATHWAYS IN DIABETIC NEUROPATHY. *TRENDS NEUROSCI*. 2013; 36(8): 439-49.

ZHANG JM, AN J. CYTOKINES, INFLAMMATION, AND PAIN. *INT ANESTHESIOLOG CLIN*. 2007; 45(2): 27-37.

ZIMMERMANN M. ETHICAL GUIDELINES FOR INVESTIGATIONS OF EXPERIMENTAL PAIN IN CONSCIOUS ANIMALS. *PAIN*. 1983; 16(2): 109-10.

ZYCHOWSKA M, ROJEWSKA E, PRZEWLOCKA B, MIKA J. MECHANISMS AND PHARMACOLOGY OF DIABETIC NEUROPATHY - EXPERIMENTAL AND CLINICAL STUDIES. *PHARMACOL REP*. 2013; 65(6): 1601-10.

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO COM DADOS REFERENTES AO TRABALHO

Lasers Med Sci (2017) 32:495–501
DOI 10.1007/s10103-016-2140-3

ORIGINAL ARTICLE

Photobiostimulation reverses allodynia and peripheral nerve damage in streptozotocin-induced type 1 diabetes

Igor Rafael Correia Rocha¹ · Adriano Polican Ciena² · Alyne Santana Rosa¹ · Daniel Oliveira Martins¹ · Marucia Chacur¹

Received: 1 November 2016 / Accepted: 26 December 2016 / Published online: 30 January 2017
© Springer-Verlag London 2017

Abstract For better evaluation of the efficacy of low-level laser therapy in treating painful diabetic neuropathy and in protecting nerve fiber damage, we conducted a study with type 1 diabetic rats induced by streptozotocin. It is well known that diabetic peripheral neuropathy is the leading cause of pain in those individuals who suffer from diabetes. Despite the efficacy of insulin in controlling glucose level in blood, there is no effective treatment to prevent or reverse neuropathic damage for total pain relief. Male Wistar rats were divided into saline, vehicle, and treatment groups. A single intraperitoneal (i.p.) injection of streptozotocin (STZ) (85 mg/kg) was administered for the induction of diabetes. The von Frey filaments were used to assess nociceptive thresholds (allodynia). Behavioral measurements were accessed 14, 28, 48, and 56 days after STZ administration. Rats were irradiated with GaAs Laser (Gallium Arsenide, Laserpulse, Ibramed Brazil)

emitting a wavelength of 904 nm, an output power of 45 mWpk, beam spot size at target 0.13 cm², a frequency of 9500 Hz, a pulse time 60 ns, and an energy density of 6.23 J/cm². The application of four sessions of low-level laser therapy was sufficient to reverse allodynia and protect peripheral nerve damage in diabetic rats. The results of this study indicate that low-level laser therapy is feasible to treat painful diabetic condition in rats using this protocol. Although its efficacy in reversing painful stimuli and protecting nerve fibers from damage was demonstrated, this treatment protocol must be further evaluated in biochemical levels to confirm its biological effects.

Keywords Diabetes mellitus · Sciatic nerve · Nociception · Myelin sheath · Rat · Streptozotocin

Abbreviations

i.p. Intraperitoneal
STZ Streptozotocin

Introduction

Diabetes is a chronic condition that occurs when the body cannot produce or use enough insulin, and it is diagnosed by increased levels of glucose in the blood. Insulin is a hormone produced by β cells in the pancreas; it is required to transport glucose from the bloodstream into the cells where it is used as energy. The lack or ineffectiveness of insulin in a person with diabetes results in high glucose concentration in the blood. Over time, the resulting high levels of glucose in the blood (hyperglycemia) cause damage to several tissues in the body, especially in the nervous system, leading to the development of disabilities and life-threatening health complications [1].

✉ Marucia Chacur
chacurm@ich.usp.br
Igor Rafael Correia Rocha
irorocha@usp.br

Adriano Polican Ciena
apciena@rc.unesp.br

Alyne Santana Rosa
alynesrosa@usp.br

Daniel Oliveira Martins
martind@usp.br

¹ Department of Anatomy, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 2415, 05508-900 São Paulo, Brazil

² Institute of Biosciences, University Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 13506900 São Paulo, Brazil

ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO EM COLABORAÇÃO

European Journal of Pharmacology 799 (2017) 111–117

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar

Neuropharmacology and analgesia

Gabapentin decreases microglial cells and reverses bilateral hyperalgesia and allodynia in rats with chronic myositis

A.S. Rosa, M.F. Freitas, I.R.C. Rocha, M. Chacur^a^a Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Chronic muscle pain
Gabapentin
Hyperalgesia
Allodynia
Astrocytes
Microglia

ABSTRACT

In the present work, we investigated the antinociceptive effect of gabapentin in a chronic myositis model and its interference in spinal glial cells. Chronic myositis was induced by injection of Complete Freund Adjuvant (CFA) into the right gastrocnemius (GS) muscle of rats and tests for evaluating mechanical hyperalgesia, thermal hyperalgesia and tactile allodynia were performed. Pharmacological treatment with gabapentin was administered intrathecally and 100 µg and 200 µg doses were tested. For analyzing astrocytes and microglia in the spinal cord, immunohistochemistry assay was performed. It was found that gabapentin 200 µg reverted CFA-induced chronic muscle pain bilaterally, in all applied tests and it was able to attenuate microglial but not astrocytes activation in the dorsal horn of spinal cord. In conclusion, gabapentin was able to inhibit hyperalgesia and allodynia in chronic myositis and also to attenuate spinal microglial activation. Therefore, gabapentin could be used as treatment for targeting chronic muscle pain.

1. Introduction

Researchers have pointed musculoskeletal pain as one of the most prevalent types of pain in the population and one of the hardest types of pain to treat (Magni et al., 1990; Teixeira et al., 2001; Miranda et al., 2012). Muscle pain can arise from disorders such as myofascial pain, fibromyalgia, myositis and strain. The muscle injury then leads to sensitization of peripheral nociceptors and dorsal horn neurons, transmitting nociceptive information to higher brain centers and results in hyperalgesia and allodynia (Hoheisel et al., 1994, 1998; Shuka et al., 2001; Schafers et al., 2003).

Studies have demonstrated that glia cells are involved in nociception, especially in chronic conditions (Watkins and Maier, 2003a; Tsuda et al., 2005; Milligan and Watkins (2009) by releasing pro-inflammatory substances, playing a relevant role in the transmission of nociceptive information (Watkins and Maier, 2003a; Watkins et al., 2003b; Marchand et al., 2005) and leading to allodynia and hyperalgesia (Sweitzer et al., 1999; Milligan et al., 2000). Studies also demonstrated that chronic myositis induced into the muscle tissue leads to morphological and functional alterations of astrocytes and microglia (Tenschert et al., 2004; Chacur et al., 2009).

Gabapentin, an anticonvulsant with few side effects, has been reported to have antinociceptive effect in chronic pain states, such as diabetes, neuropathic pain and arthritis (Yang et al., 2012; Ali et al., 2015; Park et al., 2015; Zvejniece et al., 2015). It is thought that its

mechanism of action is by reducing neural hyperexcitability by binding to the $\alpha 2/\delta$ -1 subunit of dependent voltage calcium channel present in neurons (Cheng and Chien, 2006; Tsukumo et al., 2011; Zhou and Luo, 2014; Morikawa et al., 2015). However, its use in chronic musculoskeletal pain remains unclear. In the present study we induce chronic myositis to investigate whether gabapentin is able to reverse chronic muscle pain and interfere in astrocytes and microglial cells.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (60–80 days old; 200–220 g; Institute of Biomedical Sciences Central Biotery, University of São Paulo) were housed with food and water available *ad libitum* at room temperature of 22 ± 2 °C. All rats were maintained on a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 07h) and were given two days to adapt to the experimentation room. All experimental procedures were conducted in accordance with the University of São Paulo Institutional Animal Care Committee (certification 47/2013). Animals were handled considering the principles and animal laboratory guide involving pain and nociception (Zimmermann, 1983).

^a Correspondence to: Av. Prof. Lúcio Pires 2415, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil.
E-mail address: chacur@ich.usp.br (M. Chacur).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.02.012>

Received 16 August 2016; Received in revised form 26 January 2017; Accepted 7 February 2017

Available online 10 February 2017

0014-2999/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.