Mara Evany de Oliveira Silva

**Terapia LASER de baixa intensidade no controle da dor neuropática crônica e
na regeneração do nervo isquiático de ratos**

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

**São Paulo
2019**

Mara Evany de Oliveira Silva

**Terapia LASER de baixa intensidade no controle da dor neuropática crônica e
na regeneração do nervo isquiático de ratos**

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

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Marucia Chacur

Versão original

**São Paulo
2019**

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)

Evany de Oliveira Silva, Mara
Terapia LASER de baixa intensidade no controle
da dor neuropática crônica e na regeneração do nervo
isquiático de ratos / Mara Evany de Oliveira Silva;
orientador Marucia chacur. -- São Paulo, 2019.
67 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Dor Neuropática. 2. Hiperalgesia. 3. LASER de
baixa intensidade. 4. Substância P. 5. Fator de
crescimento neural. I. chacur, Marucia ,
orientador. II. Título.

	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.006/2015.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 010/13/CEUA, datado de 05.02.13, e por solicitação do Profa. Dra. **Marucia Chacur**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Mara Evany de Oliveira Silva** ao Projeto de Pesquisa "*Avaliação da radiação LASER AsGa 904nm sobre o processo algico no modelo de dor neuropática em ratos*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 23 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da CEUA

ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Mara Evany de Oliveira Silva

Título da Tese: Terapia LASER de baixa intensidade no controle da dor neuropática crônica e na regeneração do nervo isquiático de ratos

Orientador (a): Marucia Chacur

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

☐ **Aprovado (a)**

☐ **Reprovado**

Examinador (a) Assinatura:.....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador (a) Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador (a) Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Presidente Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Dedico este trabalho ao meu amado esposo e a minha querida irmã que não me deixaram perder para mim mesma, e em especial aos amores da minha vida meus filhos Gustavo e Mateus de onde tiro forças para continuar lutando.

Obrigada ♥

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Aos Meus queridos amigos neurodor, obrigada por tudo, vocês moram em meu coração ♥. Em especial a Alyne e Marina. Meninas, muito obrigada pelo companheirismo vocês são de longe as melhores e tornaram minha jornada muito mais leve.

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

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

Agradeço a Deus por ter me dado também minha irmã Irani “Nia” não sei o que seria de mim, minha querida se não fosse você, que é sem dúvida minha companheira, minha amiga, confidente e minha coluna forte. Te amo mana, e todos os dias agradeço a Deus por ter me dado a melhor irmã do mundo.

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

Agradecimentos á Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento deste projeto inscrito por meio número do processo 2014/24660-2 vigência 01/03/2015 a 30/06/2018.

“Lamentar uma dor passada, no presente, é
criar outra dor e sofrer novamente.”

William Shakespeare

RESUMO

Oliveira ME. **Terapia LASER de baixa intensidade no controle da dor neuropática crônica e na regeneração do nervo isquiático de ratos.** Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2019.

A técnica de laserterapia é um método não invasivo utilizado por diversas áreas da saúde, e tem se mostrado eficaz no tratamento da diminuição da sensibilidade a dor. O presente estudo visa elucidar os efeitos desta terapia nas alterações moleculares induzida pela constrição crônica (CCI) do nervo isquiático de ratos. Esta técnica é aplicada em dias intercalados e tem a duração de 10 sessões. Ao finalizarmos o tratamento com laserterapia os animais foram eutanasiados e os gânglios das raízes posteriores (DRG L4–L6) e o nervo isquiático foram retirados para posterior análise. Os DRG's foram processados para detecção da Substância P (SP) e do receptor de potencial transitório vanilóide tipo I (TRPV1). Ainda submetemos o nervo isquiático para a detecção do fator de crescimento neural (NGF) e proteína zero (P0). Nossos resultados demonstraram uma reversão da hipernocicepção dos animais tratados com LASER. Ainda, observamos um aumento da expressão de SP e TRPV1 nos animais com lesão e uma diminuição após o tratamento com LASER. Com relação aos ensaios referente ao nervo isquiático, podemos observar que houve um aumento da densidade óptica para o NGF e para a P0 após tratamento. Esses resultados podem ser observados de modo qualitativo por meio da técnica de imunohistoquímica de fluorescência. Nossos resultados em conjunto, demonstram a eficácia da laserterapia para reversão da hipernocicepção dos animais com lesão. Ainda, esta técnica é capaz de modular liberação de mediadores que participação do processo algico, além de induzir a regeneração do nervo isquiático.

Palavras chaves: Hiperalgesia. Dor Neuropática. LASER de baixa intensidade. Substância P. TRPV1. NGF. Proteína zero.

ABSTRACT

Oliveira ME. **Low intensity LASER therapy in the control of chronic neuropathic pain and the regeneration of the ischial nerve of rats.** Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 2019.

The laser therapy technique is a noninvasive method used by several health areas, and has been shown to be effective in treat pain sensitivity. The present study aims to elucidate the effects of this therapy on molecular changes induced by chronic constriction (CCI) in rats. This technique was applied every other day, during 10 sessions. At the end of treatment, the animals were euthanized and the posterior root ganglia (DRG L4-L6) and sciatic nerve were removed for further analysis. The DRG's were processed for the detection of Substance P (SP) and transient potential receptor type I (TRPV1). In addition, we submit the sciatic nerve for the detection of neural growth factor (NGF) and zero protein (P0). Our results demonstrated a reversal of hypernociception in animals treated with LASER. Furthermore, we observed an increase in SP and TRPV1 expression in animals with lesion and a decrease after LASER treatment. With respect to the tests referring to the sciatic nerve, we could observe that there was an increase in the optical density for NGF and P0 after treatment. These results can be observed qualitatively by fluorescence immunohistochemistry. Our results together demonstrate the efficacy of laser therapy for the reversal of hypernociception of animals with lesions. Furthermore, this technique is able to modulate the release of mediators that participate in the algic process; in addition, this technique is also able to induce regeneration of sciatic nerve in rats.

Key words: Hyperalgesia. Neuropathic pain. Low intensity laser. Substance P. TRPV1. NGF. protein zero.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Corte transversal mostrando os revestimentos dos nervos periféricos

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

Figura 3 - Ilustração do teste de pressão de pata

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

Figura 5 - Ilustração do teste de hiperalgesia térmica - Hargreaves

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

Figura 7 – Efeito sobre a resposta ao estímulo mecânico (Hiperalgesia mecânica)

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

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

Figura 10 – Efeito da técnica de laserterapia em animais controles.

Figura 11 - Fotomicrografia eletrônica de transmissão do nervo isquiático direito.

Figura 12 - Avaliação da morfometria após a técnica de laserterapia.

Figura 13 - Efeito do NGF no nervo isquiático após a CCI e tratamento com LASER.

Figura 14 – Efeito da Proteína Zero (P0) no nervo isquiático após a CCI e tratamento com LASER.

Figura 15 – Efeito da aplicação do Laser na síntese do NGF no nervo isquiático de ratos.

Figura 16 – Efeito da Técnica de laserterapia na síntese da Proteína zero no nervo isquiático de ratos.

Figura 17 – Efeito da Técnica de laserterapia na síntese da Substância P no DRG de ratos.

Figura 18 – Efeito da Técnica de laserterapia na síntese do TRPV1 no DRG de ratos.

Figura 19 – Efeito da Técnica de Termografia infravermelho antes e depois do tratamento com laserterapia.

Figura 20 – Análise dos dados da técnica de termografia infravermelho em ratos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

14d - Décimo quarto dia

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

CGRP - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CCI - Lesão por constrição crônica

CCI +LASER – Lesão por constrição crônica com LASER

DRG – Gânglio da raiz posterior

FOP - Falso operado

GFAP - Proteína glial fibrilar ácida

LASER – Amplificação da Luz por Emissão de Radiação Estimulada (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*)

LBI – LASER de baixa intensidade

L4 – Quarta vértebra lombar

L5 – Quinta vértebra lombar

MI – Medida Inicial

NK1 – Neurocinina 1

NKA – Neurocinina A

NKB – Neurocinina B

NGF – Fator de crescimento neural

SNP – Sistema nervoso periférico

SP – Substância P

P0 – Proteína zero

TRPV1 – Receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Dor Neuropática	17
1.2 O uso do LASER como potencial terapêutico	18
1.3 Lesão nervosa periférica	20
1.4 Participação da substância P (SP) e do receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) após indução dor neuropática periférica	24
1.5 Justificativa e hipótese	26
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Animais	28
3.2 Indução da dor neuropática	28
3.3 Planejamento dos grupos experimentais	29
3.4 Avaliação da sensibilidade dolorosa	30
3.4.1 Determinação da hiperalgesia mecânica	30
3.4.2 Determinação da alodinia mecânica	31
3.4.3 Determinação da hiperalgesia térmica	32
3.5 Procedimento terapêutico – Técnica Laserterapia	34
3.6 Técnica de Microscopia eletrônica de transmissão	36
3.7 Ensaio de Imuno-histoquímica de fluorescência	36
3.8 Ensaios de Western Blot	37
3.9 Técnica de termografia infravermelha	38
3.10 Análise estatística	38
4. RESULTADOS	39
4.1 Efeito laserterapia sobre a nocicepção induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI)	39
4.1.1 Efeito sobre a resposta ao estímulo mecânico (Hiperalgesia mecânica)	39
4.1.2 Efeito sobre a resposta ao estímulo tátil (alodinia mecânica)	40
4.1.3 Efeito da resposta ao estímulo térmico (hiperalgesia térmica)	41
4.2 Efeito da laserterapia em animais controles	42
4.3 Avaliação da estrutura do nervo isquiático por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão	43
4.3.1 Avaliação da morfometria após a técnica de microscopia eletrônica de transmissão	43

4.3 Efeito da laserterapia na imunoreatividade de diferentes mediadores	45
4.3.1 Efeito sob o Fator de crescimento neural (NGF) no nervo isquiático	45
4.3.2 Efeito sob a proteína zero (P0) no nervo isquiático	46
4.5 Efeito da aplicação do LASER nos parâmetros celulares por meio dos ensaios de Western Blot	47
4.5.1 Expressão do Fator de crescimento neural (NGF) no nervo isquiático de ratos.....	47
4.5.2 Expressão da Proteína zero (P0) no nervo isquiático de ratos	48
4.5.3 Expressão da substância P no gânglio da raiz posterior de ratos	48
4.5.4 Expressão do receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) no gânglio da raiz posterior dos ratos	49
4.6 Imagens da termografia infravermelho nos diferentes grupos.....	50
4.6.1 Imagens termográficas após aplicação do LASER em animais com e sem neuropatia periférica	50
4.6.2 Resultado estatísticos das imagens termográficas após aplicação do LASER em animais com e sem neuropatia periférica.	51
5. DISCUSSÃO.....	53
CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS	60

---

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dor Neuropática

Desde o princípio da humanidade o ser humano está ligado à dor. Esse por sua vez atribuía tal condição a valores de crença de cada povo. A dor crônica é super complexa e de difícil resolução para muitos doentes. Sua persistência tem influência na deteriorização da qualidade de vida do indivíduo. O alívio da dor é de prioridade absoluta, e determinante para equipe multiprofissional da saúde. A dor foi definida pela Associação internacional para o Estudo da dor (IASP) em 1986, como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tecidual real ou potencial descrita em termos de tal dano”(Biro, 2010). Ainda segundo a NeuPSIG (Grupo de Interesse Especial de Dor Neuropática) em 2008 definiu a dor neuropática sendo uma dor que surge em consequência direta de uma lesão ou doença que afeta o sistema somatosensorial (Treede et al., 2008).

Ao ocorrer uma lesão nos nervos periféricos em humanos geralmente resulta-se em dor persistente ou crônica, caracterizada por dor espontânea em queimação, acompanhada de alodinia (dor em resposta a estímulos não lesivos) e hiperalgesia (dor exagerada em resposta a estímulos lesivos) (Payne, Norfleet, 1986).

A dor neuropática é uma combinação complexa sensorial que inclui perda parcial ou total da sensibilidade. Esse tipo de dor está associado em várias doenças como: diabetes, amputações, lesões na medula espinal entre outras. Embora existam diversos tratamentos para a dor neuropática, ela ainda é uma condição de difícil tratamento (Narain, 2017).

Diversos estudos clínicos e experimentais visam elucidar os mecanismos envolvidos na dor neuropática, devido essa dor ser persistente mesmo após a retirada do estímulo nociceptivo, e pode ocorrer mesmo quando esse estímulo é indetectável. A dor neuropática pode ocorrer devido alterações nos neurônios e nas fibras que conduzem a informação nociceptiva (Thacker, 2007). Contudo as respostas dos pacientes portadores de dor neuropática não apresentam resultados satisfatórios com as terapêuticas convencionais, devido a esses não combaterem a dor de forma

---

eficaz. Tratamento como: ablação neural, medicamentosos como, ansiolíticos, antidepressivos, anticonvulsivantes, administração sistêmica de anestésicos, analgésicos narcóticos e não narcóticos (Galer, 1995; Sah et al., 2003). Nesse sentido nas últimas décadas tratamentos não medicamentosos como Laser foi utilizado como adjuvante ao tratamento convencional e tem se mostrado eficaz no controle das mais diversas síndromes álgicas, com, por exemplo, no controle da dor lombar crônica, neuralgia trigeminal entre outras (Bjordal et al., 2003; Martins et al., 2013; Medalha et al., 2012).

1.2 O uso do LASER como potencial terapêutico

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

O LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* – amplificação da luz por emissão de radiação estimulada) se diferencia por ter em sua característica a monocromaticidade (único sentido de cor), a coerência (sincronismo em que as ondas seguem o mesmo tempo e espaço) e a colimação que são ondas paralelas e unidirecionais, diferenciando-se de outras formas de emissão de luz como, por exemplo, a luz incandescente (comum) que se perde no tempo e espaço, uma vez que esse tipo de luz é incoerente, tanto a luz do LASER quanto a de uma lâmpada comum, é emitida quando um átomo é elevado a um nível de excitação e perde energia, porém a luz comum diferentemente do LASER possui uma grande variabilidade de comprimento de ondas, o que faz com que ela se perca no tempo e espaço. Outra diferença entre as duas fontes de luz é a quantidade de do número de fótons por unidade de área de emissão, que no LASER é muito maior do que em qualquer outra fonte de luz (Abrahams; Friedman, 1996; Moura, 2009) (Oliveira et al., 2017). Em 1916 foi descrito por Albert Einstein sobre a forma de emissão do LASER, sendo ele uma energia não ionizante e altamente concentrada. O resultado de sua ação é dependente do tecido a ser irradiado (Nascimento, 2001). Seu mecanismo de ação vem sendo discutido na literatura e a hipótese aceita é que as mitocôndrias são seu alvo chave para desencadear sua ação benéfica nos tecidos alvos.

Porém seus mecanismos de ação não estão bem elucidados, uma hipótese é que sua luz age sobre moléculas fotossensíveis denominadas cromóforos (Abrahams; Friedman, 1996).

Os cromóforos absorvem a energia e interagem com moléculas denominadas citocromo c oxidase que são capazes de se oxidar, resultando assim na ativação da cadeia respiratória e com isso melhorando o funcionamento das mitocôndrias (Aanonsen et al., 1990) (Sato, 2006).

Nos últimos anos as pesquisas realizadas com LASER principalmente o de baixa intensidade (LBI), vem apresentando resultados satisfatórios como acelerador da cicatrização de feridas, poder de analgesia em diversos sintomas dolorosos, por liberação de β -endorfina (Aanonsen et al., 1990; Ferreira, 2006; Hashmi et al., 2010a; Oliveira et al., 2017b; Yan et al., 2011).

Estudo feito por Ebrahimi et. al 2018 utilizando LASER de baixa intensidade para tratar neuralgia do trigêmeo, sendo essa dor uma das piores descritas na literatura. Os pesquisadores puderam observar que os pacientes que foram submetidos à laserterapia juntamente com o tratamento farmacológico tiveram melhoras superiores do que os pacientes com tratamento convencional (Ebrahimi, 2018).

Micheli L et. al 2017 realizaram um estudo com diversos modelos de dor em ratos. Esses animais foram submetidos à dor articular aguda e crônica e dor neuropática por compressão (CCI) e trataram os animais com laser de baixa intensidade. Os pesquisadores observaram melhora significativa nos animais que foram submetidos à laserterapia do que os foram tratados com ondas de choque (Micheli, 2017)

Sendo a dor neuropática de difícil tratamento e podendo levar o paciente a uma condição de isolamento psicossocial, muitos pesquisadores têm tentado desenvolver terapias para se obter sucesso no tratamento desse tipo de dor, nos últimos anos os pesquisadores vêm utilizando o LBI por ser uma técnica não invasiva e de baixo custo que tem se mostrado eficaz no controle das mais diversas dores crônicas (Tam, 1999).

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

---

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

Ainda um estudo feito por Andrade et al. 2017 com ratos submetidos a CCI os pesquisadores observaram que os animais apresentaram melhores após o LBI tanto nos testes comportamentais quanto na dosagem de Beta- endorfina (de Andrade, 2017).

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

Assim, acreditamos que os efeitos do LASER 904nm possam estar associados a alterações celulares no gânglio da raiz posterior do nervo espinal (DRG), bem como na alteração de fatores neurotróficos como, por exemplo, o fator de crescimento neural (NGF), proteína zero (P0), TRPV1 e a substância P (SP), fatores importantes para o desencadeamento de neuropatias periféricas e reparos neurais (Adam et al., 1991; Martins et al., 2012)

1.3 Lesão nervosa periférica

O sistema nervoso periférico tem sua unidade funcional o neurônio, que é constituído por um corpo celular, esse por sua vez se localiza na medula espinal e no gânglio da raiz posterior, que por sua vez tem sua expansão, sendo ela a fibra nervosa, formada pelo axônio e a bainha conjuntiva que o envolve, o endoneuro. O corpo celular possui prolongamentos denominados dendritos (Adori et al., 2005; Adrega da Silva et al., 2010). Alguns neurônios são envoltos por uma camada de mielina, produzida pelas células de *Schwann*, e neurônios não mielinizados. Em neurônios mielinizados existem uma pequena estrutura denominadas de nódulos de *Ranvier*, que são responsáveis pela condução saltatória, onde ocorrem as trocas iônicas (Adrega da Silva et al., 2010).

O nervo periférico consiste em feixes de fibras nervosas. Dentre esses feixes o endoneuro, que é um envoltório de tecido conjuntivo, esta bainha protege as fibras contra choques mecânicos. Fibras de diferentes tamanhos se agrupam formando os fascículos nervosos, esses por sua vez estão envolvido por um tecido conjuntivo forte e denso, sendo ele o perineuro que protege os nervos de traumas externos. O perineuro forma uma barreira entre as fibras nervosas e outros tecidos. Ainda por sua vez, existe um envoltório de tecido conjuntivo denominado de epineuro, que envolve todos os fascículos. Nas articulações o perineuro e o epineuro externo são mais espessos, para proteger os nervos periféricos durante os movimentos (Figura1) (Adrega Da Silva et al., 2009; Anand et al., 1995; Machado, 1993).

Figura 1 – Corte transversal mostrando os revestimentos dos nervos periféricos.

Fonte: (Adrega Da Silva et al., 2009)

Após ocorrer uma lesão no nervo periférico, podemos observar alguns processos regenerativos protagonizados por meio de fagocitose (macrófagos), onde ocorre degeneração dos axônios. Durante esse processo células de *Schwann* em constante proliferação seguido de síntese de fatores de crescimento no coto proximal desse axônio, formam uma ponte de fibrina para que os cotos sejam conectados. Subsequente irá ocorrer o brotamento do axônio proximal para o

---

axônio distal, e com isso ocorre à mielinização dos axônios pelas células de *Schwann* (Beaulieu et al., 1988; Delmotte et al., 2009; Hunt; Mantyh, 2001; Sah et al., 2003).

Simultaneamente a este processo, é construída uma ponte de fibrina que irá conectar os cotos do axônio para que se inicie a regeneração do nervo periférico, ocorrendo o brotamento axonal do coto proximal ao coto distal, seguindo de uma mielinização pelas células de *Schwann* (Sah et al., 2003);(Beaulieu et al., 1988). Ocorrendo então a regeneração do sistema nervoso periférico, sendo este um fenômeno que apresenta uma complexidade para que o microambiente do nervo lesado se restabeleça e concomitantemente haja homeostasia (Delmotte et al., 2009; Hunt; Mantyh, 2001).

Para que se restabeleça a comunicação ao longo do nervo é necessário seu crescimento, e para isso são necessárias proteínas que irão desempenhar o crescimento e diferenciação do tecido nervoso, dentre essas proteínas está fator de crescimento neural (NGF) (Bear et al., 2002; Pezet; McMahon, 2006). Esse neuropeptídeo pertence á um grupo de substâncias neurotróficas dentre elas estão o NT-3 e NT-4 que são fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF) que desempenha a reparação dos tecidos nervosos (Bear et al., 2002). Para que o NGF desempenhe seu papel é necessário que haja um receptor, nesse caso existem dois receptores no qual irá ocorrer essa ligação, são eles o receptor Tirosina Kinase (Trka) e o p75 (p75NTR). Cada receptor tem uma função específica, quando o receptor Trka está ativado promove a diferenciação e a sobrevivência do tecido nervoso, já o p75 provavelmente promove a morte celular programada (apoptose) (Chao, 2003).

O NGF vem sendo utilizado na clínica como potencial terapêutico em várias doenças degenerativas, e também em processos inflamatórios por ser mediador da inflamação (Apfel, 2002). Alguns trabalhos sugerem que o bloqueio contra o NGF tem resultados satisfatórios contra a hiperalgesia (Ro et al., 1999) (Da Silva, 2017).

Em um estudo feito por Herzberg, et al., (1997), utilizando a constrição crônica do nervo isquiático (CCI), os animais desenvolveram hiperalgesia térmica, mecânica e alodínia. Os autores sugeriram que o NGF é o responsável nesses fenômenos, isso se dá pela codificação feita pelo RNAm no nervo isquiático e no DRG. Os autores ainda sugerem que, a utilização de soro anti-

---

NGF atrasa o aparecimento desses fenômenos causados por processos inflamatórios (Herzberg et al., 1997).

Em contra partida estudos realizado pelo nosso grupo de pesquisa, demonstraram que animais experimentais (ratos *wistar*) submetidos ao modelo de esmagamento do nervo alveolar inferior apresentavam uma diminuição da expressão do NGF no nervo alveolar durante o estímulo tátil, e uma melhora para o quadro hipernociceptivo e aumento do NGF após submeterem os animais ao tratamento com laser de baixa intensidade, sugerindo uma contribuição do NGF para a reparação do tecido nervoso e melhora o quadro de hipernocicepção desses animais (de Oliveira Martins et al., 2013).

Silva et. al., (2015) em um estudo com constrição crônica do nervo isquiático (CCI) em ratos, observaram que os animais submetidos à técnica de mobilização neural, houve um aumento dos níveis de NGF e melhora do comportamento doloroso dos animais, quando comparados aos animais que não foram tratados (Adler et al., 1996).

Além do NGF as células de *Schwann* também participam do processo de reparação dos nervos periféricos. Cada axônio é revestido de camadas lipídicas que dão origem a bainha de mielina, essa camada constituída por lipídios isola eletricamente os axônios propiciando que a condutibilidade do impulso elétrico seja aumentada (Chavez, 1997; Fox, 2007; Tortora, 2007). O isolamento propiciado pelo envolvimento da célula de *Schwann* no axônio se dá por meio da membrana plasmática que é dependente de moléculas adesivas que mantém membrana basal e axônio bem aderidos.

Para que a regeneração periférica ocorra de forma favorável, temos que nos atentar para alterações do microambiente da lesão, tal como componente da matriz extracelular que atua como sinalizador com fatores de crescimento e moléculas que propiciam a regeneração (Tucker; Mearow, 2008). Uma proteína que é responsável por desempenhar um importante papel na regeneração nervosa periférica é a proteína zero, que é uma proteína estrutural e específica da bainha de mielina, ela é tida como um indicador no processo de mielinização (Wang et al., 2011).

Essa proteína é responsável pela formação da bainha de mielina que por sua vez envolvem os axônios proporcionando assim uma condução mais rápida dos sinais elétricos (Rotenstein et al., 2008). Já o fator de crescimento neural atua promovendo a diferenciação e

---

proliferação de neurônios modulando a reparação dos nervos lesionados, e promove ainda a extensão dos axônios e mielinização dos cotos periféricos proximais (Zochodne, 2000).

E relações à utilização da técnica de laserterapia estudos demonstram sua eficácia para a modulação do crescimento neural. Um estudo feito por Mashhoudi et al. (2017), onde os pesquisadores esmagaram o nervo ciático de ratos com uma lâmina microcirúrgica e logo após tratados com laser, os pesquisadores relataram melhora da reparação, tal qual diminuição da degeneração walleriana, com conseqüente aumento das células de *Schwann*. Além da diminuição de tecido cicatricial e com aumento do diâmetro do axônio e de sua quantidade (Mashhoudi Barez et al., 2017).

Em outro estudo também utilizando esmagamento do nervo ciático, os pesquisadores dividiram ratos em grupos com irradiação imediata e tardia, sete dias após o procedimento, e concluíram por meio de testes histológicos que o laser acelera a reparação nos dois grupos além de diminuição do edema e promove fibras axonais mais densas. Porém, o grupo que teve seu tratamento tardio apresentou melhor recuperação (Akgul et al., 2014).

Portanto, diferentes métodos terapêuticos, vêm sendo utilizados para facilitar esse processo. Na fisioterapia é comum a utilização de técnicas não invasivas como: ultra-som, mobilização neural e a fotobiestimulação, que além de propiciar efeito analgésico também colabora para o crescimento neural (Anders et al., 2004; Oliveira et al., 2017b).

1.4 Participação da substância P (SP) e do receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) após indução dor neuropática periférica

Após a lesão do nervo periférico, ocorre um aumento da expressão dos receptores de TRPV1 nos neurônios mielinizados, e essa alteração contribui para o desenvolvimento da hiperalgesia (Ueda, 2006). O receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) é constituído por seis domínios transmembrânicos, sendo encontrado na membrana celular e no retículo sarcoplasmático. Sendo esse um receptor de capsaicina (encontrado na pimenta) e nos neurônios dos gânglios das raízes posteriores (DRG's) esse receptor desempenha um papel na sinalização de dor, sensibilizando assim o neurônio aferente primário que por sua vez despolariza

---

os neurônios de segunda ordem (Nakanishi et al., 2010; Staaf et al., 2010). O aumento da expressão dessa proteína está relacionado ao desenvolvimento de hiperalgesia térmica e alodinia, e consequentemente também estão envolvidos com a dor neuropática. Estudos apontam que o bloqueio dos receptores de TRPV 1 revertem o quadro de hiperalgesia e alodinia (Vilceanu et al., 2010). Ainda, estudos mostram que o TRPV1 responde a outros estímulos como, por exemplo, agentes pró inflamatórios endógenos como, o fator de crescimento neural (NGF), histamina, bradicinina entre outros, além de alterações de pH provocados por lesões (pH 5,2) bem como, alteração da temperatura corporal ($>43\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Chuang et al., 2001; Zhang et al., 2005).

O receptor de TRPV1 é amplamente encontrado em estruturas que formam o sistema nervoso como, por exemplo: medula espinal, substância cinzenta periaquedutal (PAG) e nos gânglios posteriores da medula espinal onde se encontram os neurônios mielinizados e não mielinizados, fato esse que levou os pesquisadores acreditarem que o TRPV1 possa ter envolvimento com dores crônicas e agudas (Cortright; Szallasi, 2004; Guo et al., 1999; Hwang; Valtschanoff, 2003; Zhou et al., 2008; Zhou et al., 2001). Acredita-se que o TRPV1 propaga a sensação dolorosa desencadeando a liberação de diversos neurotransmissores e entre eles a substância P, liberada nas terminações nervosas livres, o que resulta em inflamação neurogênica (Pailleux et al., 2012).

Com relação à substância P (SP), ela é um neuropeptídeo que age em receptor NK1, sendo encontrado principalmente no encéfalo, e acoplado a proteína G. Estudos realizados evidenciaram que neurônios do tipo C, ou seja, não mielinizados que estão no gânglio da raiz posterior são sensíveis para SP, ainda em outro estudo foi possível observar o envolvimento do receptor NK1 em modelo de dor Neuropática induzido por constrição crônica do nervo isquiático, o que levou os cientistas a acreditarem que a SP é responsável pela hipernocicepção em ratos, ainda quando bloqueados o receptor esse quadro é revertido (Bie; Zhao, 2011; Hökfelt, 1991), Cahill, Coderre, 2002).

Porém é controversa a ação da SP na dor, estudos indicam uma diminuição da imunoreatividade no DRG após uma axotomia, em contra partida outros estudos indicam um aumento da imunoreatividade da SP no DRG após lesão parcial do nervo (Lagraize et al., 2010; Ma; Bisby, 1998; Mansikka et al., 2000; Sapunar et al., 2012; Ueda, 2006). Baseados no efeito dual deste

---

mediador resolvemos avaliar o papel desta substância no nosso modelo experimental, visto que a SP é de extrema importância em fenômenos nociceptivos.

1.5 Justificativa e hipótese

Alternativas terapêuticas para o tratamento da dor neuropática se fazem necessárias, uma vez que essa modalidade de dor não responde satisfatoriamente a nenhum tipo de intervenção convencional, ou seja, cirúrgica e medicamentosa. O presente projeto torna-se importante devido, na última década, surgir diversos trabalhos na literatura, utilizando a técnica de fotobioestimulação, porém com diferentes parâmetros de energia, tempo e local de aplicação. Os efeitos deste tipo de tratamento é bastante promissor, uma vez que esta técnica é capaz de induzir analgesia em diferentes modelos de dor crônica que é clinicamente relevante e de difícil tratamento. A técnica também tem se mostrado eficaz na regeneração dos nervos periféricos, uma vez que esses nervos precisam estar em perfeita condição para desempenhar suas funções. Portanto, estaremos elucidando os mecanismos moleculares (SP, TRPV1, NGF e P0) e efeitos metabólicos (termografia) envolvidos na dor neuropática induzida pelo modelo de constrição crônica do nervo isquiático, após a utilização do LASER de baixa intensidade. Cabe mencionar que este trabalho já vem sendo desenvolvido no laboratório desde meu mestrado, onde padronização a energia, tempo e local de aplicação e no momento estamos tentando compreender melhor outros mediadores periféricos envolvidos no modelo experimental.

A nossa hipótese de trabalho é que possivelmente os animais com dor neuropática crônica apresentem melhora nos comportamentos dolorosos, bem como diminuição dos mediadores moleculares pró-nociceptivos, aumento do fator regenerativo no nervo e melhora da perfusão tecidual após a aplicação da laserterapia. O projeto foi realizado no laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor, que por sua vez, tem esta linha de pesquisa já consolidada, e realizaremos a técnica de Termografia Infravermelha com a colaboração do Dr. Marcos Leal Brioschi (Médico pesquisador do Centro de Dor do HC-FMUSP).

---

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos sobre as alterações moleculares, comportamental e temperatura cutânea decorrentes da dor neuropática em ratos *Wistar*, antes e depois do tratamento com laserterapia.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Induzir a dor neuropática em ratos *Wistar* e utilizar como procedimento terapêutico a técnica de laserterapia já adaptada e padronizada pelo Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor;
- ✓ Avaliar o comportamento do animal por meio dos testes de hiperalgesia mecânica, alodinia mecânica e hiperalgesia térmica frente à dor neuropática e tratamentos;
- ✓ Análise da microscopia eletrônica de transmissão;
- ✓ Análise da participação do NGF e da P0 na reparação do Nervo Isquiático, por meio do ensaio de imuno-histoquímica de fluorescência;
- ✓ Analisar a participação da Substância P e TRPV1 no gânglio da raiz posterior, através de ensaios de *Western Blot*;
- ✓ Analisar a participação da Proteína Zero (P0) e NGF na reparação do Nervo Isquiático, por meio de *Western Blot*;
- ✓ Análise da termografia infravermelho.

---

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

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

3.2 Indução da dor neuropática

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

---

animais operados, com a exposição do nervo isquiático, porém sem a amarradura ao redor do nervo (Bennett; Xie, 1988).

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

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

3.3 Planejamento dos grupos experimentais

Utilizamos um total de 60 animais (15 animais por grupo em 4 grupos). Os animais foram alocados conforme divisão dos grupos abaixo. Todos os animais foram inicialmente submetidos aos testes comportamentais de acordo com os tempos de tratamento. Após todos os procedimentos comportamentais, os animais foram eutanasiados no mesmo período, ou seja, 20 dias pós a laserterapia, e a seguir os tecidos coletados foram submetidos aos ensaios de *Western blot* (N=5/grupo) e imuno-histoquímica de fluorescência (N= 5/grupo). Sendo que para ter quantidade suficiente de material/proteína, o N de um (1) animal, para os ensaios de *Wester blot*, foi necessário juntar tecido de 3 animais, então para cada grupo foram utilizados 15 animais.

- **Grupo 1: ratos controle (NAIVE):** animais sem nenhum tipo de lesão ou tratamento;
- **Grupo 2: ratos controle (FOP):** ratos falso operados **sem** tratamento, e eutanasiados 20 dias após a laserterapia;
- **Grupo 3: ratos experimentais (CCI LASER):** ratos com hipernocicepção, tratados com laserterapia a partir do 14º dia após a cirurgia, e eutanasiados após a 10ª sessão de laser 20 dias após o tratamento;

- **Grupo 4: ratos experimentais (CCI)**: ratos com hipernocicepção (CCI - operado no mesmo dia do grupo 2), porém **sem** tratamento com laserterapia, e eutanasiados 20 dias após a aplicação do LASER.

3.4 Avaliação da sensibilidade dolorosa

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

3.4.1 Determinação da hiperalgesia mecânica

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

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

Figura 3 - Ilustração do teste de pressão de pata

3.4.2 Determinação da alodinia mecânica

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

No grupo crônico este teste foi aplicado antes do procedimento cirúrgico para obtenção da (medida inicial), após 14 dias da lesão, para avaliar se o procedimento cirúrgico (CCI) induziu a

---

hiperalgesia e ao longo do tratamento com laserterapia, com a finalidade de avaliar se este tratamento melhora da resposta nociceptiva.

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

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

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

3.4.3 Determinação da hiperalgesia térmica

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

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

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

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

Figura 5 - Ilustração do teste de hiperalgesia térmica - Hargreaves

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

3.5 Procedimento terapêutico – Técnica Laserterapia

Para tratar os ratos que foram submetidos ao modelo de dor neuropática, utilizamos como modalidade terapêutica a técnica de laserterapia e adaptada em nosso laboratório- Neuroanatomia funcional da dor (figura 6), conforme artigo publicado (Oliveira et al., 2017b).

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

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

Inicialmente os ratos foram anestesiados com Isoflurano (anestésico inalatório - Cristália LTDA) com fluxo contínuo de oxigênio (5 L/ min) na posição de decúbito lateral esquerdo (painel A). Após a anestesia, iniciamos o tratamento dos animais, posicionamos a caneta na região da injúria para realização da técnica (Painel B). No Painel C e D podemos observar o aparelho LASER Pulse Ibramed, utilizado para o procedimento da técnica de laserterapia ilustrando dosimetria (descrita na tabela abaixo-Tabela 1). A primeira sessão de laserterapia foi iniciada no 14º dia após indução da lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI), a

seguir, os animais foram tratados em dias intercalados, ou seja, dia sim, dia não, somando um total de 10 sessões de laserterapia (21 dias). No final do procedimento, os animais foram sacrificados e os tecidos coletados para análise.

Tabela 1- Especificações sobre os parâmetros do LASER

INFORMAÇÕES DO APARELHO	
Fabricante	IBRAMED
Identificação do modelo	LASERPULSE Diamond
Tipo emissor	GaAs
PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO	
Comprimento de onda [nm]	904 nm
Mode de operação	Pulsado
Frequência [Hz]	9500 Hz
Duração do pulso [sec]	60 ns
Forma do feixe	Circular
PARAMETROS PARA O TRATAMENTO	
Tamanho do feixe no ponto alvo [cm ²]	0.1 cm ²
Tempo de exposição [sec]	18s
Exposição radiante [J/cm ²]	6J/cm ²
Energia radiante [J]	6J
Potência de saída	70Wpk
Número de pontos irradiados	9
Area irradiada [cm ²]	0.9 cm ²
Técnica de aplicação	Em contato com a pele
Número e frequência de sessões do tratamento	10 sessões, realizadas a cada dois dias
Energia radiante total [J]	30J por sessão, 300J ao total das sessões

Tabela 1 - Tabela inclui os mais importantes parâmetros do LASER como parâmetros sobre feixe de luz, dose utilizada e técnica de aplicação. De acordo com Jenkins et al. 2011(Abelev et al., 2006; Abraham et al., 2002; Oliveira et al., 2017b).

3.6 Técnica de Microscopia eletrônica de transmissão

Para a microscopia eletrônica de transmissão, os animais foram anestesiados via intraperitoneal, com urethane (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, de Almeida et al. 2012). Após a dissecação dos músculos da região posterior da coxa, o nervo isquiático direito foi coletado. As amostras foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% a 4 °C e posteriormente imersas em solução aquosa de acetato de uranila 5% em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série crescente de alcoóis, imersas em óxido de propileno e incluídas em resina Spurr. Cortes semi-finos foram realizados no ultramicrotomo 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 and Yamada 1983). As telas foram examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1010, do Departamento de Anatomia da Universidade de São Paulo.

3.7 Ensaio de Imuno-histoquímica de fluorescência

Após a indução do modelo de dor crônica e o tratamento com laserterapia, os diversos grupos de animais foram anestesiados (cetamina e xilazina 1:1, 100µL/100g de peso corpóreo) e submetidos à perfusão transcardíaca, com solução salina (300 mL), seguida de solução fixadora (300 mL) constituída de paraformaldeído 4% dissolvido em tampão fosfato 0,1 M (PB, pH 7,4). Após a perfusão, o nervo isquiático foi coletado e armazenado em paraformaldeído 4%, durante 4 horas. Após este período, o material foi transferido para uma solução contendo sacarose a 30% em PB para crioproteção. Após 24 horas, os tecidos foram cortados em uma espessura de 14 mm em um criostato. Os cortes foram incubados à metodologia imuno-histoquímica de fluorescência

---

com anticorpo primário para NGF e P0 (fator de crescimento neural e proteína zero - 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Europa), e anticorpo secundário para fluorescência TRICT (1:100) (vermelho) (Jackson ImmunoResearch/EUA). A imunorreatividade foi analisada em microscópio Nikon Eclipse 80i equipado com epifluorescência e uma câmera digital Nikon DXM 1200F. Foram analisados em torno de quinze (15) cortes por grupo, a análise foi qualitativa a fim de especificar a localização e expressão do Fator de crescimento Neural (NGF) e Proteína zero (P0).

3.8 Ensaios de Western Blot

Cabe mencionar que inicialmente, os animais foram avaliados nos testes comportamentais, posteriormente, submetidos aos procedimentos cirúrgicos e/ou terapêuticos, sendo sacrificados (utilizando guilhotina), para a retirada dos tecidos. O nervo isquiático e os gânglios da raiz dorsal (L4- L6) dos animais experimentais (CCI e CCI+Laser) e controle (FOP e NAIVE) foram retirados para análise. O conteúdo protéico do material isolado dos animais foi dosado pelo método de Bradford (Amresco, U.S.A) (Bradford, 1976). Após a dosagem os tecidos foram submetidos à eletroforese por SDS-PAGE. Os materiais foram diluídos em um mesmo volume de tampão Tris/HCl 125 mM, pH 6,8, contendo 2,5% (p/v) de SDS, 2,5% de 2-mercaptoetanol (2-ME), 4 mM de EDTA e 0,05% de azul de bromofenol, e as amostras foram posteriormente fervidas em banho-Maria por cinco minutos. O material foi aplicado num gel de poliacrilamida a 12% e submetido à eletroforese com corrente constante de 25 mA (Laemmli, 1970). Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, 0,2um de diâmetro) de acordo com a técnica descrita por Towbin et al. (1979). Os antígenos presentes na membrana de nitrocelulose foram submetidos à caracterização imunoenzimática. Após bloqueio com leite desnatado (Molico, Nestlé) 5% em tampão Tris-Salina (Tris 10 mM e NaCl 0,15 M, pH 7,5), por 2 horas, as membranas foram incubadas, por 18 horas a 4⁰C, com anticorpo monoclonal específico para NGF: anti-NGF (F30, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology) (Wu et al., 2007), Proteína Zero PO: anti-PO (1:1000; Abcam) (Briani et al., 2008; Jang; Svaren, 2009), TRPV1 (1:1000 - Santa Cruz – Biotechnology – Santa Cruz, CA) e Substância P (1:1000 – Millipore Corporation). Em seguida, as membranas foram lavadas com

---

solução basal e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário marcado com peroxidase de raiz forte (goat anti rabbit HRP IgG (1:5.000; Chemicon). O controle endógeno foi marcado com β -actina (1:10000, Sigma), e ao término as membranas foram lavadas novamente com solução basal. Após a lavagem as membranas foram reveladas utilizando o Kit ECL (Amersham Biosciences, NJ/EUA) de quimioluminescência e analisadas quanto à densidade óptica das bandas marcadas, utilizando o programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD/EUA), e corrigido pela densidade óptica para a β -actina, considerando as amostras dos animais controle como o padrão para a normalização dos resultados.

3.9 Técnica de termografia infravermelha

Realizamos a captura da imagem termográfica de cada animal na mesma sala dos testes comportamentais com as descrições citadas acima, os animais foram mantidos em gaiolas de 30 cm por 20 cm e permaneceram isolados nessas gaiolas (um animal/gaiola) por uma hora para se adaptarem e minimizar o estresse no momento da coleta da imagem que teve o tempo de duração de 30 minutos. Foi utilizada uma câmera termográfica (FLIR Systems Inc. modelo T650sc) e um computador com o software específico para a aquisição e processamento de imagens termográficas (FLIR ResearchIR 9.0). A câmera termográfica utilizada tem uma resolução real integrada de 640x480 pixels, a qual possui sensores que permitem medir as temperaturas variando de -40°C a 2.000°C. Essa câmera tem sensibilidade para detectar diferenças de temperaturas menores que 0.03°C e possui exatidão de $\pm 1\%$ da temperatura absoluta (Sacharuk, Lovatel et al. 2011)

3.10 Análise estatística

Os dados foram representados como média $\pm$ E.P.M. A análise estatística foi gerada utilizando o programa GraphPad Prism versão 5 (utilizando-se GraphPad Software Inc., CA, USA). A comparação estatística entre os grupos foi realizada usando a análise de variância de duas vias (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni. O índice de significância foi considerado de $p \leq 0,05$ (Sokal; Rohlf, 1981).

4. RESULTADOS

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

4.1.1 Efeito sobre a resposta ao estímulo mecânico (Hiperalgisia mecânica)

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

Figura 7 - Efeito da técnica de laserterapia sob a resposta nociceptiva nos ratos com lesão no nervo isquiático. O limiar de dor determinado pelo teste de Randall & Selitto e expresso

em gramas foi avaliado antes do procedimento cirúrgico (MI), 14 dias (14d) após lesão e diversos tempos após o tratamento com Laser. Os resultados apresentam a média de $\pm$ EPM de 10 animais por grupo. * $p < 0,001$ em comparação com a MI; *** $p < 0,001$ em comparação entre o grupo CCI+Laser e o grupo CCI.

4.1.2 Efeito sobre a resposta ao estímulo tátil (alodinia mecânica)

Conforme observado no experimento anterior, após a lesão constritiva crônica do nervo isquiático (CCI) observamos uma diminuição do limiar tátil, quando comparado à medida inicial e aos grupos controles (FOP e o NAIVE). Identificamos também, uma reversão do limiar nociceptivo nos animais tratados com Laser a partir da 2ª sessão, a qual se manteve até a décima sessão. Animais falso-operados não apresentaram diferença em relação à medida inicial (figura 8).

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

O limiar de alodinia, avaliado pelo teste de Von Frey e expresso em gramas foi determinado antes (MI), 14 dias e em diversos tempos após a lesão. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 10 animais por grupo. * $p < 0,001$ em comparação com a MI; *** $p < 0,001$ em comparação entre o grupo CCI+LASER e o grupo CCI.

4.1.3 Efeito da resposta ao estímulo térmico (hiperalgesia térmica)

Resultados semelhantes foram observados com relação à hiperalgesia térmica. Observamos uma diminuição do limiar térmico nos animais lesionados, quando comparado à medida inicial e aos grupos controles (FOP e o NAIVE) e uma melhora após tratamento com laser. Os animais controles não apresentaram diferença em relação à medida inicial (figura 9).

Figura 9 - Efeito da técnica de laserterapia sob a resposta nociceptiva (estimulação térmica) nos ratos com lesão no nervo isquiático. O limiar térmico avaliado pelo teste de Hargreaves expresso em segundos foi avaliado antes do procedimento cirúrgico (MI), 14 dias (14d) e diversos tempos após o tratamento com LASER. Os resultados apresentam a média de $\pm$ EPM de 10 animais por grupo. * $p < 0,001$ em comparação com a MI; *** $p < 0,001$ em comparação entre o grupo CCI+LASER e o grupo CCI.

4.2 Efeito da laserterapia em animais controles

Com intuito que verificar se existiria alguma possível alteração nos grupos controles, esta próxima imagem avalia a resposta nociceptiva nos diferentes grupos controles: A) Hiperalgesia mecânica, B) alodinia mecânica e C) hiperalgesia térmica (Figura 10). Nossos resultados demonstram que não houve diferença estatística nos grupos ao longo do de todo tempo de análise comportamental. Portanto, utilizamos o grupo Naive como controle em nossos experimentos a seguir.

Figura 10 - Efeito da técnica de laserterapia em animais controles. O limiar nociceptivo avaliado, 14 dias (14d) e diversos tempos após o tratamento com LASER. Os resultados apresentam a média de $\pm$ EPM de 10 animais por grupo. Não houve diferença estatística entre os diferentes grupos.

4.3 Avaliação da estrutura do nervo isquiático por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão

Analizamos a estrutura do nervo isquiático dos animais: NAIVE, FOP, CCI e CCI+LASER. Nos grupos controles (NAIVE e FOP), foi possível observar fibras intactas quando comparamos com demais grupos (Figura 11). No grupo CCI podemos observar uma diminuição de fibras quando comparado ao grupo tratado (CCI+LASER). Com relação ao tratamento, podemos observar bainha regenerada ou em processo de regeneração.

Figura 11 - Fotomicrografia eletrônica de transmissão do nervo isquiático direito. Os grupos NAIVE e FOP demonstram distribuição regular de fibras não mielinizadas indicadas por asteriscos (*). No grupo submetido a CCI podemos observar um intenso processo de degeneração Walleriana, porém ainda constam algumas fibras mielinizadas intactas indicadas por setas. No grupo CCI + LASER a figura indicada por setas demonstra uma intensa regeneração das fibras mielinizadas. (N- Núcleo das células de Schwann)

4.3.1 Avaliação da morfometria após a técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

As imagens abaixo demonstram a quantificação realizada nas imagens anteriormente demonstrada. Quando avaliamos a espessura da bainha de mielina (Figura 12 A), observamos que após a lesão foi possível observar uma diminuição da espessura da mielina quando comparado com o grupo controle (Naive) e esta diminuição se manteve, mesmo após o tratamento com o laser. Na imagem B, não foi possível observar alteração estatística com relação ao diâmetro da

fibra nervosa e na imagem C observamos uma diminuição do diâmetro do axônio no grupo lesionado quando comparado com controle (Naive).

Figura 12 – Avaliação da morfometria após a técnica de laserterapia. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo. No gráfico A - * $p < 0.05$ comparamos os animais NAIVE com os demais grupos. No Gráfico C - ** $p < 0.05$ quando parado o grupo NAIVE com o CCI. * $p < 0.05$ entre os grupos FOP e CCI.

4.3 Efeito da laserterapia na imunoreatividade de diferentes mediadores

Cabe mencionar que os ensaios de imunoreatividade apresentados a seguir, são apenas para demonstrar a localização da marcação, ou seja, uma forma qualitativa e não quantitativa dos resultados. Estes dados ajudarão na discussão junto com os resultados de *Western blot*, onde foi possível quantificar as mesmas proteínas.

4.3.1 Efeito sob o Fator de crescimento neural (NGF) no nervo isquiático

Ao analisarmos o NGF no nervo isquiático, observamos uma imunoreatividade basal nos animais controles (NAIVE e FOP) e uma diminuição no grupo com lesão crônica (CCI). Por outro lado, quando os animais foram submetidos a sessões de laserterapia, observamos um aumento desta neurotrofina quando comparamos com os demais grupos.

Figura 13- Efeito do NGF no nervo isquiático após a CCI e tratamento com LASER. Animais NAIVE e FOP (falso operado) utilizados como controle. Grupo CCI e CCI+LASER grupos experimentais.

4.3.2 Efeito sob a proteína zero (P0) no nervo isquiático

Ao analisar a proteína zero (P0) no nervo isquiático, observamos que houve uma diminuição da imunoreatividade nos animais submetidos a cirurgia (CCI) com consequente aumento dessa proteína nos animais tratados com laserterapia (CCI+LASER), corroborando com nossos experimentos quantitativos que serão descritos a seguir.

Figura 14- Efeito da Proteína Zero (P0) no nervo isquiático após a CCI e tratamento com LASER. Animais NAIVE e FOP (falso operado) utilizados como controle. Grupo CCI e CCI+LASER grupos experimentais.

4.5 Efeito da aplicação do LASER nos parâmetros celulares por meio dos ensaios de Western Blot

4.5.1 Expressão do Fator de crescimento neural (NGF) no nervo isquiático de ratos

Com relação à avaliação do Fator de crescimento neural, observamos uma diminuição da densidade óptica das bandas marcadas para essa proteína no grupo CCI quando comparado aos controles (Naive e FOP). No entanto, após a última sessão do tratamento, observamos uma reversão deste efeito, ou seja, observamos um aumento da expressão do NGF (CCI + LASER) chegando a níveis basais (figura 15).

Figura 15 - Efeito da aplicação do LASER na síntese do NGF no nervo isquiático de ratos.

Quantificação da densidade óptica do Fator de crescimento neural. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo. * $p < 0.05$ quando comparamos os animais CCI aos demais grupos.

4.5.2 Expressão da Proteína zero (P0) no nervo isquiático de ratos

Após realização dos ensaios comportamentais, e tratamento com laserterapia, o nervo isquiático foi coletado e foi realizado quantificação para observação da Proteína Zero. Nossos resultados demonstram um aumento, mesmo que sutil, na expressão da Proteína Zero do grupo com lesão (CCI), cabe mencionar, que este aumento não foi estatisticamente significativo. Porém, após a última sessão de tratamento (CCI + Laser), observamos um aumento significativo quando comparamos com os demais grupos (figura 16).

Figura 16 - Efeito da Técnica de laserterapia na síntese da Proteína zero no nervo isquiático de ratos. Quantificação da densidade óptica da Proteína zero. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo. * $p < 0.05$ quando comparamos os animais CCI+ LASER aos demais grupos.

4.5.3 Expressão da substância P no gânglio da raiz posterior de ratos

Após tratamento com Laserterapia e realização dos ensaios comportamentais, o gânglio da raiz dorsal foi coletado e foi realizada a quantificação da expressão de Substância P. Nossos

resultados demonstram um aumento, na expressão dessa proteína no grupo com lesão (CCI) e uma diminuição após a última sessão de tratamento com LASER (CCI + LASER) (figura 17). Não foi possível observar alteração entre os controles (NAIVE e FOP).

Figura 17 - Efeito da Técnica de laserterapia na síntese da Substância P no DRG de ratos.

Quantificação da densidade óptica da Substância P. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo. * $p < 0.01$ quando comparamos os animais CCI com o grupo CCI+LASER.

4.5.4 Expressão do receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) no gânglio da raiz posterior dos ratos

Após realização dos ensaios comportamentais e tratamento, o gânglio da raiz dorsal foi coletado e foi realizada quantificação para observação do TRPV1. Os resultados demonstram aumento na expressão dessa proteína no grupo com lesão (CCI) e uma diminuição após a última sessão de tratamento com LASER (CCI + LASER) (figura 18).

Figura 18 - Efeito da Técnica de laserterapia na síntese do TRPV1 no DRG de ratos.

Quantificação da densidade óptica do TRPV1. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo. * $p < 0.05$ quando comparamos os animais CCI e os demais grupos.

4.6 Imagens da termografia infravermelho nos diferentes grupos

4.6.1 Imagens termográficas após aplicação do LASER em animais com e sem neuropatia periférica

A termografia infravermelho é uma técnica de imageamento, que nos permite por meio de captações de ondas infravermelho visualizar uma possível alteração no padrão normal/basal. Após identificar o problema, podemos melhor direcionar para um posterior tratamento. A quantificação das imagens estão detalhadas no próximo gráfico.

Figura 19 - Efeito da Técnica de Termografia infravermelho antes e depois do tratamento com laserterapia.

4.6.2 Resultado estatísticos das imagens termográficas após aplicação do LASER em animais com e sem neuropatia periférica.

Quando analisamos as imagens, podemos observar um aumento da intensidade do calor no grupo lesionado (CCI) que foi diferente estatisticamente dos controles (NAIVE e FOP) e CCI+LASER, ou seja, houve um aumento da intensidade no animal com lesão. Ainda, após o tratamento (CCI +LASER) observamos uma diminuição do delta da intensidade de calor. Cabe mencionar que não houve nenhuma diferença estatística em relação aos grupos controles NAIVE e FOP (falso operado).

Figura 20 – Análise dos dados da técnica de termografia infravermelho em ratos. * $p < 0,05$ quando comparamos o grupo CCI com demais; ** $p < 0,05$ entre CCI + LASER e CCI.

---

5. DISCUSSÃO

O objetivo desse trabalho é avaliar a eficácia do LASER de baixa intensidade (LBI) após indução de dor neuropática crônica por meio da constrição do nervo isquiático de ratos (CCI). A lesão por constrição crônica consiste em fazer quatro amarraduras frouxas ao redor do nervo isquiático, essa constrição tem por objetivo ocasionar respostas nociceptivas (dolorosas) em modelos experimentais (Bennett; Xie, 1988). A dor que persiste mesmo após o estímulo ser cessado é caracterizada como dor crônica, este tipo de dor aflige um quinto da população mundial. Existem evidências que os casos de dor crônica persistente são decorrentes de inflamações dos nervos periféricos, e o seu bloqueio segue com alívio da dor (Minett et al., 2014).

A dor ocorre por meio da ativação dos nociceptores, esses por sua vez estão presentes em diversos tecidos, e também são chamados de receptores sensoriais. São encontrados em sua maioria na pele, e podem ser ativados por estímulos mecânicos, térmicos e químicos, e conduzem os impulsos elétricos por meio das fibras c que são amielínicas e por fibras A e β . Após lesão tecidual ocorre liberação de mediadores pró nociceptivos, que irão agir sobre essas terminações, ocorrendo então sua ativação e a exacerbação da sensibilidade resultando em hiperalgesia mecânica, térmica e alodínia (Abbott et al., 1997; Dray, 1997).

Assim, padronizamos o modelo de lesão nervosa periférica em ratos para induzirmos a CCI conforme descrito Bennett and Xie 1988. Quatorze dias após a cirurgia os animais apresentaram um quadro de hipernocicepção, o que nos permitiu padronizar o modelo, corroborando assim com a literatura (Bennett; Xie, 1988; Payne; Norfleet, 1986).

Após escolha e padronização do modelo, buscamos na literatura trabalhos onde demonstram o uso da laserterapia ou atualmente chamado como fotobioestimulação, como tratamento. Na literatura, é descrito que o LASER resulta em efeito analgésico tanto em animais quanto em humanos (Marinho et al., 2014; Oliveira et al., 2017a; Qamruddin et al., 2017).

Com a finalidade de compreender o efeito induzido pelo LASER, a técnica foi padronizada em nosso laboratório para o tratamento de animais com lesão nervosa, e com esse entendimento auxiliar no tratamento de pacientes na prática clínica.

Estudos mostram que a utilização do LASER associado a prática medicamentosa, tem potencializado o efeito analgésico em paciente que apresentam neuralgia trigeminal. Os pacientes apresentando neuralgia do trigêmeo associado com 100mg de carbamazepina tiveram um melhor alívio dos sintomas dolorosos, quando comparados ao que somente receberam o tratamento farmacológico (Ebrahimi et al., 2018). Um outro estudo em ratos utilizando dois (2) tipos de lesões, sendo elas: dor articular induzida por monoiodoacetato de sódio (MIA) e adjuvante de Freund (CFA), e neuropatia induzida por CCI, os autores observaram melhora desses animais após aplicação do LASER. Nos animais com lesão articular o efeito anti-hiperalgésico foi notado 5 minutos após o tratamento, demonstrando a eficácia da laserterapia que também pode ser observada nos animais submetidos a CCI (Micheli et al., 2017).

Ainda Mojarad N et. al., (2018), em um estudo onde submeteram ratos a lesão espinal com o intuito de avaliar a dor neuropática, e a expressão da interleucina 6 os autores observaram que os animais apresentaram melhora após o tratamento com laserterapia, tanto para os efeitos colaterais pós trauma quanto para a o comportamento motor (Mojarad et al., 2018).

Em nossos estudos podemos observar a eficácia da laserterapia como tratamento para esse tipo de dor que é de tão difícil resolução. Nossas observações foram baseadas nos resultados apresentados no decorrer do projeto, onde foram utilizados testes comportamentais para tal análise. Os animais utilizados foram submetidos a lesão do nervo isquiático (CCI) e quatorze dias após a cirurgia foram tratados com LASER de baixa intensidade durante 10 sessões. Cada sessão foi realizada em dias intercalados e após a finalização da terapia diferentes tecidos foram retirados para futura análise.

Foi observado uma resposta positiva nos testes comportamentais, ou seja, a partir da segunda sessão de tratamento com o LASER observamos essa reversão do quadro algico. Esta melhora se manteve até a décima sessão, ou seja, 34 dias após cirurgia. Cabe mencionar que estes resultados já foram publicados e podem ser observados com maiores detalhes no referido artigo (Oliveira et al., 2017).

A utilização de terapias não invasiva vem sendo uma alternativa para a efetividade do tratamento das neuropatias, e o LASER vem sendo amplamente utilizado por ser de baixo custo. Apesar da sua efetividade citada na literatura, ainda não se chegou a um consenso referente a comprimentos de ondas e nem densidade de energia aplicada para tal técnica. Porém, a literatura apoia seu uso para tratamento das mais diferenciadas algias com resultados positivos e consequente diminuição de dores.

Em um estudo com o modelo de esmagamento do gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos realizado por Chen YJ et. al., (2014), foi observado que após os animais serem submetidos a laserterapia houve uma melhora da hiperalgesia e consequente reparação do tecido nervoso que pode ser observado em testes de imuno- histoquímica (Chen et al., 2014).

Com base nos mais diversos estudos citados na literatura e com o sucesso na padronização da laserterapia em pesquisa experimental, nós passamos a estudar as alterações morfológicas nos tecidos dos animais submetidos a CCI. Com base nos resultados descritos no presente projeto foi observado por meio da técnica de *Western blot*, que houve um aumento do fator de crescimento neural (NGF) e proteína zero (P0) no nervo isquiático dos animais submetidos a CCI e tratados com LASER. Ainda, podemos observar por meio da imuno-histoquímica de fluorescência que houve um aumento da imunoreatividade para esses mesmos marcadores.

Nossos resultados sugerem a participação da laserterapia na reparação nervosa, favorecendo o crescimento neural, uma vez que o papel do NGF e da PO estão muito bem descritos em processos de regeneração da bainha de mielina.

O NGF, como já mencionado, desempenha um papel muito importante sobre a sobrevivência, diferenciação e crescimento neural; esse neuropeptídeo é produzido e liberado pelos tecidos alvos sendo absorvido de forma retrógrada para manter a sobrevivência neuronal (Gravvanis et al., 2004).

Estudos relatam que a administração de NGF exógeno na porção terminal de nervos pode proteger os neurônios ganglionares da coluna vertebral após a lesão do nervo periférico, e por outro lado, o NGF pode promover a extensão axonal e mielinização (Zochodne, 2000). Maiores estudos devem ser realizados para uma melhor compreensão do envolvimento do NGF no modelo experimental de dor neuropática de ratos tratados com esta técnica. Bem como, a

---

complementação dos resultados para um melhor detalhamento do modelo experimental escolhido.

Ainda além de o NGF ter participação fundamental no crescimento neural, existe também a bainha de mielina que serve de camada protetora que isola o axônio através da membrana plasmática que possui moléculas altamente adesivas mantendo assim a membrana basal aderida ao axônio. O componente principal no sistema nervoso periférico é a proteína zero (P0), que é uma glicoproteína responsável pela formação da bainha de mielina que também aumenta a condutibilidade do impulso elétrico ao longo do axônio (Rotenstein et al., 2008). Em relação a laserterapia na reparação neural periférica, estudos demonstraram que o tratamento com LBI, nas extremidades do coto transecionado, acelerou o crescimento neural e aumento do diâmetro da bainha de mielina quando comparado aos animais sem tratamento {Shen, 2013 #8976}. Este estudo corrobora com as nossas imagens morfológicas feitas por meio de microscopia eletrônica de transmissão que nos demonstram intenso processo de regeneração neural nos animais submetidos a CCI com posterior tratamento com LASER.

Baseado em nossos resultados, podemos sugerir que a resposta álgica induzida pela lesão crônica do nervo isquiático, pode ser devido o NGF em regular mediadores que participam do processo álgico, tais como a SP, o que poderia conduzir a esta sensibilização de longa duração sugerida no trabalho de Malcangio et al., (2000) (Malcangio et al., 2000). Para que esta hipótese seja respondida, avaliamos a expressão de substância P (SP) e do TRPV1 no gânglio da raiz posterior (DRG) dos animais. Nossos resultados demonstraram uma diminuição expressiva da substância P (SP) e do TRPV1 no DRG dos animais tratados com laser e comparados aos animais apenas com lesão CCI.

A sensibilização e a transmissão da dor é regulada pela SP, que atua sobre o receptor neuroquinina 1 (NK-1), essa substância é expressa nos neurônios pós sináptico da medula espinal e em neurônios do DRG, que são co-expressos com o TRPV1, que é um receptor de capsaicina (Skoff; Adler, 2006).

Dentre os peptídeos envolvidos com a dor podemos citar a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). A SP, juntamente com a neurocinina A (NKA) e a neurocinina B (NKB), constitui a família das taquicininas que podem mediar sinapses entre as

---

fibras aferentes primárias e o neurônio do corno dorsal da medula, importantes para a nocicepção, e são liberados durante a inflamação. Esses dados descritos na literatura nos leva a crer que estes mediadores estão envolvidos na hipernocicepção induzidas em modelos de dor crônica em ratos.

Com relação ao TRPV1, já é demonstrado, que ele é expresso nos terminais centrais e periféricos de fibras sensoriais do tipo C e Aδ, e podem ser ativados por diferentes estímulos. Uma via que poderia levar à sensibilização do receptor TRPV1 e consequente geração de estados hiperalgésicos é a via de interação com receptores NK-1 para a SP (Zhang et al., 2007). Entretanto sabemos que o calor leva a ativação desse mediador, pensando nisso utilizamos a técnica de termografia infravermelho que é um método de auxílio no diagnóstico que é capaz de captar pontos de calor na pele e transformá-los em imagens. A microcirculação é responsável pela alteração de temperatura na pele que é gerado em tecidos profundos, e controlado pelo sistema neurovegetativo simpático e conduzido a superfície cutânea sendo impossível de ser detectados a olho nu. Deste modo utilizamos a termografia para avaliar uma possível alteração de temperatura apresentada na pele dos animais. Com base em nossos resultados podemos observar que os animais submetidos a CCI tem um aumento da temperatura cutânea quando comparamos aos animais controles. Após o tratamento com a laserterapia, onde observamos uma redução da intensidade da temperatura.

Demonstrando mais uma vez que o LASER é eficaz no controle do processo inflamatório e consequentemente regulando a temperatura local (Brioschi et al, 2007).

Em síntese, o tratamento com LASER 904nm foi capaz de reverter o quadro algico induzido pela constrição no nervo isquiático, conforme observado nos testes comportamentais. Observamos ainda por meio da técnica de *western blot* e demonstrado também, pelos testes de imuno-histoquímica de fluorescência que houve diminuição na expressão e da imunoreatividade, de mediadores como SP, TRPV1, PO e NGF nos animais com dor neuropática e que receberam tratamentocom LASER. Demonstramos também uma melhora no processo de regeneração periférica conforme observado nas imagens do nervo periférico.

Ainda, outros estudos realizados pelo nosso grupo, demonstraram que os animais submetidos a neuropatia do nervo alveolar inferior e, neuropatia diabética posteriormente tratados com LASER, tiveram uma melhora no quadro algico, e na reparação neural nos afirmando mais

---

uma vez, a importância do LASER como uma ferramenta terapêutica para o controle da dor neuropática e regeneração neural (Martins et al., 2012) (Rocha, 2017).

CONCLUSÃO

Até o presente momento, podemos afirmar que o LASER de baixa intensidade contribui para a melhora da hiperalgesia em ratos com dor neuropática crônica induzida pela CCI. Com base nos nossos resultados também sugerimos que a diminuição hiperalgésica se dá por meio da modulação da SP e TRPV1 no gânglio da raiz dorsal após laserterapia. Além disso, acreditamos que o LASER contribui para a regeneração neural periférica, aumentando os níveis de NGF e PO no nervo isquiático.

Um ponto de grande relevância é de que o tratamento proposto além de reverter o quadro hipernociceptivo, também foi capaz de proporcionar regeneração do nervo isquiático concomitantemente, sendo evidenciado por meio de análises de imuno-histoquímica e microscopia eletrônica de transmissão.

Porém cabe mencionar que são necessários mais estudos para que possamos entender os mecanismos de ação do LASER, para que se possa elucidar por onde são mediados seus efeitos benéficos para que possam ser cada vez mais aprimorados.

REFERÊNCIAS

- Aanonsen LM, Lei S, Wilcox GL. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. *Pain*. 1990; 41(3): 309-21.
- Aathimanikandan SV, Sandanaraj BS, Arges CG, Bardeen CJ, Thayumanavan S. Effect of guest molecule flexibility in access to dendritic interiors. *Org Lett*. 2005; 7(14): 2809-12.
- Abbott FV, Hong Y, Blier P. Persisting sensitization of the behavioural response to formalin-induced injury in the rat through activation of serotonin2A receptors. *Neuroscience*. 1997; 77(2): 575-84.
- Abelev BI, Aggarwal MM, Ahammed Z, Amonett J, Anderson BD, Anderson M, Arkhipkin D, Averichev GS, Bai Y, et al. *Phys Rev Lett*. 2006; 97(25): 252001.
- Abraham J, Bardelay D, Kopp C, Kleinke JD, Bennion E. Education and debate: Making regulation responsive to commercial interests: streamlining drug industry watchdogs. *BMJ*. 2002; 325(7373): 1164-9.
- Abrahams MB, Friedman CP. Preclinical course-evaluation methods at U.S. and Canadian medical schools. *Acad Med*. 1996; 71(4): 371-4.
- Adam L, Laroche A, Barden A, Lemieux G, Pallotta D. An unusual actin-encoding gene in *Physarum polycephalum*. *Gene*. 1991; 106(1): 79-86.
- Adler V, Pincus MR, Polotskaya A, Montano X, Friedman FK, Ronai Z. Activation of c-Jun-NH2-kinase by UV irradiation is dependent on p21ras. *J Biol Chem*. 1996; 271(38): 23304-9.
- Adori C, Kovacs GG, Low P, Molnar K, Gorbea C, Fellingner E, Budka H, Mayer RJ, Laszlo L. The ubiquitin-proteasome system in Creutzfeldt-Jakob and Alzheimer disease: intracellular redistribution of components correlates with neuronal vulnerability. *Neurobiol Dis*. 2005; 19(3): 427-35.
- Adrega da Silva C, Bernard F, Bardet JF. Caudal cervical arthrodesis using a distractable fusion cage in a dog. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2010; 23(3): 209-13.
- Adrega Da Silva C, Bernard F, Bardet JF, Theau V, Krimer PM. Fibrotic myopathy of the iliopsoas muscle in a dog. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2009; 22(3): 238-42.
- Akgul T, Gulsoy M, Gulcur HO. Effects of early and delayed laser application on nerve regeneration. *Lasers Med Sci*. 2014; 29(1): 351-7.

Anand P, Foley P, Navsaria HA, Sinicropi D, Williams-Chestnut RE, Leigh IM. Nerve growth factor levels in cultured human skin cells: effect of gestation and viral transformation. *Neurosci Lett*. 1995; 184(3): 157-60.

Anders JJ, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy promotes regeneration and functional recovery of injured peripheral nerve. *Neurol Res*. 2004; 26(2): 233-9.

Apfel SC. Nerve growth factor for the treatment of diabetic neuropathy: what went wrong, what went right, and what does the future hold? *Int Rev Neurobiol*. 2002; 50: 393-413.

Bear FM, Connors WB, Paradiso AM. *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso*. Porto Alegre: Artmed; 2002.

Beaulieu S, Gagne B, Barden N. Glucocorticoid regulation of proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid content of rat hypothalamus. *Mol Endocrinol*. 1988; 2(8): 727-31.

Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988; 33(1): 87-107.

Bie B, Zhao ZQ. Peripheral inflammation alters desensitization of substance P-evoked current in rat dorsal root ganglion neurons. *European Journal of Pharmacology*. 2011; 670(2-3): 495-9.

Bjordal JM, Couppé C, Chow RT, Turner J, Ljunggren EA. A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. *Australian Journal of Physiotherapy*. 2003; 49(2): 107-22.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.

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.

Marcos Leal Brioschi, Lin Tchia Yeng, Elda Matilde Hidrose Pastors, Daniel Colman, Francisco M. R. Moraes Silva, Manoel Jacobsen Teixeira. *Acta Fisiatr*. 2007; 14(1): 41 - 48

Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*. 2003; 4(4): 299-309.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 1994; 53(1): 55-63.

-
- Chavez DC. Efectos de la células de Schwann en la regeneración de tejido nervioso / Effects of the Schwann cells in the nerve tissue regeneration. *Rev. cient. (Bogotá)*. 1997; 1: 65-8.
- Chen YJ, Wang YH, Wang CZ, Ho ML, Kuo PL, Huang MH, Chen CH. Effect of low level laser therapy on chronic compression of the dorsal root ganglion. *PLoS One*. 2014; 9(3).
- Chuang H, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns (4, 5) P₂-mediated inhibition. *Nature*. 2001; 411(6840): 957-61.
- Cortright DN, Szallasi A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. *European Journal of Biochemistry*. 2004; 271(10): 1814-9.
- 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.
- Delmotte A, Rigoard S, Buffenoir K, Wager M, Giot J, Robert R, Lapierre F, Rigoard P. Physiology of the injured peripheral nerve]. *Neuro-Chirurgie*. 2009; 55: S13.
- Dray A. The Pharmacology of Pain. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer; 1997. p. 21-41.
- Ebrahimi H, Najafi S, Khayamzadeh M, Zahedi A, Mahdavi A. Therapeutic and Analgesic Efficacy of Laser in Conjunction With Pharmaceutical Therapy for Trigeminal Neuralgia. *J Lasers Med Sci*. 2018; 9(1): 63-8.
- Ferreira MA. Efeitos do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização em ratos jovens e idosos: estudo morfométrico e morfológico. 1ª Ed, Altenas. 2006.
- Fox IS. *Fisiologia Humana*. São Paulo: Manole; 2007.
- Gravvanis AI, Tsoutsos DA, Tagaris GA, Papalois AE, Patralexis CG, Iconomou TG, Panayotou PN, Ioannovich JD. Beneficial effect of nerve growth factor-7S on peripheral nerve regeneration through inside-out vein grafts: an experimental study. *Microsurgery*. 2004; 24(5): 408-15.
- Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X₃ purinoceptor and IB4 binding sites. *European Journal of Neuroscience*. 1999; 11(3): 946-58.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 1988; 32: 77-88.

-
- Hashmi JT, Huang YY, Osmani BZ, Sharma SK, Naeser MA, Hamblin MR. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. *PM R*. 2010a; 2(12 Suppl 2): S292-305.
- Hashmi JT, Huang YY, Sharma SK, Kurup DB, De Taboada L, Carroll JD, Hamblin MR. Effect of pulsing in low-level light therapy. *Lasers Surg Med*. 2010b; 42(6): 450-66.
- Herzberg U, Eliav E, Dorsey JM, Gracely RH, Kopin JJ. NGF involvement in pain induced by chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Neuroreport*. 1997; 8(7): 1613-8.
- Hökfelt T. Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron*. 1991; 7(6): 867.
- Hunt SP, Mantyh PW. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2(2): 83-91.
- Hwang S, Valtchanoff J. Vanilloid receptor VR1-positive afferents are distributed differently at different levels of the rat lumbar spinal cord. *Neuroscience letters*. 2003; 349(1): 41-4.
- 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.
- Lagraize S, Guo W, Yang K, Wei F, Ren K, Dubner R. Spinal cord mechanisms mediating behavioral hyperalgesia induced by neurokinin-1 tachykinin receptor activation in the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience*. 2010; 171(4): 1341-56.
- Ma W, Bisby MA. Increase of preprotachykinin mRNA and substance P immunoreactivity in spared dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injury. *Eur J Neurosci*. 1998; 10(7): 2388-99.
- Machado A. *Neuroanatomia Funcional*, 2. a edição, Ed, in Atheneu, 1993.
- Malcangio M, Ramer MS, Boucher TJ, McMahon SB. Intrathecally injected neurotrophins and the release of substance P from the rat isolated spinal cord. *Eur J Neurosci*. 2000; 12(1): 139-44.
- Mansikka H, Sheth R, DeVries C, Lee H, Winchurch R, Raja S. NERVE INJURY - INDUCED MECHANICAL BUT NOT THERMAL HYPERALGESIA IS ATTENUATED IN NEUROKININ - 1 RECEPTOR KNOCKOUT MICE. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2000; 5(4): 242-.
- Marinho RR, Matos RM, Santos JS, Ribeiro MA, Ribeiro RA, Lima RC, Jr., Albuquerque RL, Jr., Thomazzi SM. Potential anti-inflammatory effect of low-level laser therapy on the experimental reflux laryngitis: a preliminary study. *Lasers Med Sci*. 2014; 29(1): 239-43.

Martins DD, Santos FM, Oliveira ME, Britto LR, Lemos JB, Chacur M. Laser therapy and the pain-related behavior after injury of the inferior alveolar nerve: possible involvement of neurotrophins. *J Neurotrauma*. 2012.

Mashhoudi Barez M, Tajziehchi M, Heidari MH, Bushehri A, Moayer F, Mansouri N, Safavi Naini N, Movafagh A. Stimulation Effect of Low Level Laser Therapy on Sciatic Nerve Regeneration in Rat. *J Lasers Med Sci*. 2017; 8(Suppl 1): S32-S7.

Masoumipoor M, Jameie SB, Janzadeh A, Nasirinezhad F, Soleimani M, Kerdary M. Effects of 660- and 980-nm low-level laser therapy on neuropathic pain relief following chronic constriction injury in rat sciatic nerve. *Lasers Med Sci*. 2014; 16: 16.

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.

Meert TF, Vissers K, Geenen F, Kontinen VK. Functional role of exogenous administration of substance P in chronic constriction injury model of neuropathic pain in gerbils. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003; 76(1): 17-25.

Micheli L, Di Cesare Mannelli L, Lucarini E, Cialdai F, Vignali L, Ghelardini C, Monici M. Photobiomodulation therapy by NIR laser in persistent pain: an analytical study in the rat. *Lasers Med Sci*. 2017; 32(8): 1835-46.

Minett MS, Falk S, Santana-Varela S, Bogdanov YD, Nassar MA, Heegaard AM, Wood JN. Pain without nociceptors? Nav1.7-independent pain mechanisms. *Cell Rep*. 2014; 6(2): 301-12.

Mojarad N, Janzadeh A, Yousefifard M, Nasirinezhad F. The role of low level laser therapy on neuropathic pain relief and interleukin-6 expression following spinal cord injury: An experimental study. *J Chem Neuroanat*. 2018; 87: 60-70.

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

Nascimento PM. Eefito da variação da intensidade e do comprimento de onda do LASER não cirúrgico em feridas cirúrgicas em dorso da ratos: Estudo histológico São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2001

Nakanishi M, Hata K, Nagayama T, Sakurai T, Nishisho T, Wakabayashi H, Hiraga T, Ebisu S, Yoneda T. Acid activation of Trpv1 leads to an up-regulation of calcitonin gene-related peptide

---

expression in dorsal root ganglion neurons via the CaMK-CREB cascade: a potential mechanism of inflammatory pain. *Molecular biology of the cell*. 2010; 21(15): 2568-77.

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 Photobiol Sci*. 2017a; 26(10).

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 Photobiol Sci*. 2017b; 16(4): 547-54.

Pailleux F, Lemoine J, Beaudry F. Quantitative mass spectrometry analysis reveals that deletion of the TRPV1 receptor in mice alters substance P and neurokinin A expression in the central nervous system. *Neurochemical research*. 2012; 37(12): 2678-85.

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

Pezet S, McMahon SB. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci*. 2006; 29: 507-38.

Qamruddin I, Alam MK, Mahroof V, Fida M, Khamis MF, Husein A. Effects of low-level laser irradiation on the rate of orthodontic tooth movement and associated pain with self-ligating brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2017; 152(5): 622-30.

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

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

Ro LS, Chen ST, Tang LM, Jacobs JM. Effect of NGF and anti-NGF on neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Pain*. 1999; 79(2-3): 265-74.

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

Rotenstein L, Herath K, Gould RM, de Bellard ME. Characterization of the shark myelin Po protein. *Brain Behav Evol*. 2008; 72(1): 48-58.

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

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

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

Skoff AM, Adler JE. Nerve growth factor regulates substance P in adult sensory neurons through both TrkA and p75 receptors. *Exp Neurol.* 2006; 197(2): 430-6.

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

Staaf S, Franck M, Marmigère F, Mattsson JP, Ernfors P. Dynamic expression of the TRPM subgroup of ion channels in developing mouse sensory neurons. *Gene Expression Patterns.* 2010; 10(1): 65-74.

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

Tortora JG. *Princípios de Anatomia Humana.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.

Tucker BA, Mearow KM. Peripheral sensory axon growth: from receptor binding to cellular signaling. *Can J Neurol Sci.* 2008; 35(5): 551-66.

Ueda H. Molecular mechanisms of neuropathic pain—phenotypic switch and initiation mechanisms. *Pharmacology & therapeutics.* 2006; 109(1): 57-77.

Vilceanu D, Honore P, Hogan QH, Stucky CL. Spinal nerve ligation in mouse upregulates TRPV1 heat function in injured IB4-positive nociceptors. *The Journal of Pain.* 2010; 11(6): 588-99.

Wang X, Luo E, Li Y, Hu J. Schwann-like mesenchymal stem cells within vein graft facilitate facial nerve regeneration and remyelination. *Brain Res.* 2011; 6: 71-80.

Wu CMD, Boustany L, Liang H, Brennan T. Nerve Growth Factor Expression after Plantar Incision in the Rat. *Anesthesiology.* 2007; 107(Julho): 128-35.

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

Yoshimura M, Yonehara N. Alteration in sensitivity of ionotropic glutamate receptors and tachykinin receptors in spinal cord contribute to development and maintenance of nerve injury-evoked neuropathic pain. *Neurosci Res.* 2006; 56(1): 21-8.

Zhang H, Cang CL, Kawasaki Y, Liang LL, Zhang YQ, Ji RR, Zhao ZQ. Neurokinin-1 receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKCepsilon: a novel pathway for heat hyperalgesia. *J Neurosci.* 2007; 27(44): 12067-77.

Zhang N, Inan S, Cowan A, Sun R, Wang JM, Rogers TJ, Caterina M, Oppenheim JJ. A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat-and capsaicin-gated ion channel TRPV1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005; 102(12): 4536.

Zhou HY, Zhang HM, Chen SR, Pan HL. Increased C-fiber nociceptive input potentiates inhibitory glycinergic transmission in the spinal dorsal horn. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2008; 324(3): 1000.

Zhou Y, Zhou ZS, Zhao ZQ. PKC regulates capsaicin-induced currents of dorsal root ganglion neurons in rats. *Neuropharmacology.* 2001; 41(5): 601-8.

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

Zochodne DW. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle Nerve Suppl.* 2000; 9(8): S33-8.