VICTÓRIA REGINA DA SILVA OLIVEIRA

**ESTUDO DOS MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA
ANALGESIA INDUZIDA POR TRATAMENTO COM LASER DE
BAIXA INTENSIDADE NA NEUROPATIA PERIFÉRICA
DIABÉTICA EXPERIMENTAL**

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

São Paulo
2018

VICTÓRIA REGINA DA SILVA OLIVEIRA

**ESTUDO DOS MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA
ANALGESIA INDUZIDA POR TRATAMENTO COM LASER DE
BAIXA INTENSIDADE NA NEUROPATIA PERIFÉRICA
DIABÉTICA EXPERIMENTAL**

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

Área de concentração: Anatomia

Orientadora: Prof^ª. Dra. Camila Squarzoni Dale

Versão Original

São Paulo
2018

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)

da Silva Oliveira, Victória Regina
Estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na
analgesia induzida por tratamento com laser de
baixa intensidade na neuropatia periférica
diabética experimental / Victória Regina da Silva
Oliveira; orientador Camila Squarzoní Dale. -- São
Paulo, 2018.
83 p.

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

1. Dor. 2. Laser de Baixa Intensidade. 3.
Neuropatia Diabética Periférica. 4. Analgesia. 5.
Camundongo. I. Dale, Camila Squarzoní, orientador.
II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Victória Regina da Silva Oliveira

Título da Dissertação: Estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na analgesia induzida por tratamento com laser de baixa intensidade na neuropatia periférica diabética experimental.

Orientador(a): Prof.(a) Dr(a) Camila Squarzoni Dale

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, de Mestrado realizada em ____ / ____ / ____, considerou o(a) candidato(a):

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

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instuição:

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instuição:

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instuição:

Presidente : Assinatura:

Nome:

Instuição:

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.065/2016

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 022/2014/CEUA, datado de 27/02/2014, e por solicitação da Profa. Dra. **Camila Squarzoní Dale**, do Departamento de Anatomia, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Victória Regina da Silva Oliveira**, aprovado(a) no programa de Pós-graduação Ciências Morfofuncionais, em nível de mestrado, ao Projeto de Pesquisa *"Efeito do laser de baixa potência na neuropatia periférica induzida por diabetes mellitus em camundongos"*, uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal.

São Paulo, 30 de junho de 2016.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Vice-coordenadora da CEUA-ICB/USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.096.17

São Paulo, 19 de dezembro de 2017.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado "***Efeito do laser de baixa potência na neuropatia periférica induzida por diabetes mellitus em camundongos***", registrado sob o protocolo nº **022/2014-E** e aprovado em 25/02/2014 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 25/02/2022**.

Diante desta prorrogação e da declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, autorizo a inclusão das espécies e quantidades descritas abaixo para continuidade ao referido projeto:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/Peso	Quantidade por ano
Mus musculus	C57bl/6	Macho	2 meses	100

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

Cordialmente,

Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Dedico este trabalho à minha família, pelo imenso apoio e incentivo sempre. Mãe, seu cuidado e dedicação sempre me deram força para seguir em frente. Pai, sua presença significa segurança e a certeza de que não estou sozinha nessa jornada. Obrigada por compreenderem minha ausência e apoiarem todas as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus, autor do meu destino, por sua infinita bondade, por me capacitar e por permitir que eu concluísse mais essa etapa em minha vida.

À minha orientadora querida Profa. Dra. Camila Squarzoni Dale, a qual tenho imenso carinho, respeito e admiração. Obrigada por me proporcionar essa oportunidade, por confiar no meu trabalho e me ajudar a traçar esse caminho, me orientando com tanta sabedoria, paciência e zelo. Por estar sempre presente e ser essa pessoa íntegra, que busca o correto e tenta sempre ser justa mediante as mais diversas situações.

Ao meu namorado, Eike Bianchi Kohama, por sempre estar presente, por me incentivar e apoiar, por me ouvir sempre e por ser um exemplo pra mim, quanto a dedicação e determinação em ir atrás e conquistar meus objetivos, ambos sabemos que a distância não é fácil, mas as vezes necessária.

Às minhas irmãs, cunhados e sobrinhos queridos, por todo apoio e carinho, obrigada por me receberem sempre com tamanha alegria após uma semana cheia de compromissos.

À minha querida roommate Ana Clara Pedroni, por todas as vezes que compartilhou comigo suas experiências como pós-graduanda, por todo o incentivo e força sempre.

Aos meus amigos e companheiros do laboratório de Neuromodulação da dor, Beatriz Eng, Elaine Flâmia, Elizamara Gonçalves, Heloísa Matielo, Inaeh Oliveira, João Ferrara Jr., Victhor Oliveira e Ana Caroline pelo imenso apoio nessa caminhada, por todo auxílio nos experimentos e por todas as discussões produtivas e alegres, que me permitiram amadurecer e crescer na vida científica.

Aos professores que fizeram parte da minha banca de qualificação, Prof. Dr. Jarbas Arruda Bauer, Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos e Prof. Dra. Vanessa Olzon Zambelli, pelas sugestões e discussões que colaboram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos da pós-graduação ICB USP, pela amizade, companheirismo e apoio. Vocês tornam minha jornada mais fácil e meus dias mais felizes.

Ao Prof. Dr. Il Sei Watanabe e equipe pela colaboração. Querida Sônia e amigo Diego Cury sou imensamente grata por toda a ajuda com a Microscopia Eletrônica de Transmissão, sem a ajuda de vocês esse trabalho não teria ficado tão grandioso.

Ao querido amigo Marcos Esteca, por sua colaboração na preparação e execução dos Blottings, tornando esse trabalho ainda mais completo, e também por sua colaboração intelectual, nos permitindo boas discussões científicas.

Às minhas professoras da graduação, Prof. Dra. Stella Zamuner e Prof. Dra. Andréia Silva, por todo o incentivo e pela oportunidade de iniciar minha vida acadêmica na pesquisa científica, a qual hoje tenho imenso respeito e amor.

Aos professores do Programa de Ciências Morfofuncionais por todos os ensinamentos, contribuindo direta ou indiretamente para meu crescimento acadêmico.

Ao professor Dr. Emer Ferro e equipe, em especial a Dra. Rosangela Eichler, por compartilharem seu laboratório e me ensinarem tantas coisas, agradeço imensamente essa oportunidade.

Aos funcionários do departamento de Anatomia, secretaria, recepção, segurança e limpeza, por auxiliarem nas mais diversas tarefas e resoluções de problemas do dia a dia, garantindo nossa segurança e bem-estar, tornando nossa jornada mais prazerosa.

À agência de fomento, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela bolsa de mestrado concedida (projeto nº 2016/10372-0), proporcionando o apoio financeiro que viabilizou a execução deste estudo.

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

DA SILVA OLIVEIRA, V.R. **Estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na analgesia induzida por tratamento com laser de baixa intensidade na neuropatia periférica diabética experimental.** 2018. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A neuropatia periférica (NP) causada por diabetes mellitus é uma das complicações mais comuns do diabetes, atingindo cerca de 50% dos pacientes portadores da doença. Dentre os diversos sintomas da Neuropatia Periférica Diabética (NPD), destaca-se o desenvolvimento de dor crônica, que acomete, principalmente, as extremidades, manifestando-se como respostas exacerbadas para estímulos nocivos (hiperalgesia) e dor em resposta a estímulos leves ou não dolorosos (alodínia). Os tratamentos convencionais disponíveis para a neuropatia em geral, incluindo a dor associada, ainda são inadequados, insatisfatórios e beneficiam apenas uma pequena parcela dos pacientes. Na clínica, o uso de laser de baixa intensidade (LBI) torna-se cada vez mais popular, uma vez que, por promover regeneração nervosa precoce, resulta em significativa melhora das incapacidades motoras e sensitivas geradas por diversos tipos de lesões em nervos periféricos. No entanto, embora os efeitos sejam satisfatórios, os mecanismos pelos quais estes acontecem são ainda desconhecidos. Neste estudo, o efeito da laserterapia (660 nm, 30 mW, 1,6 J/cm², 15 seg, 0.28 cm²) no tratamento da dor induzida por NPD e danos nos nervos periféricos foram avaliados em um modelo experimental de neuropatia diabética induzida por estreptozotocina em camundongos. O LBI induziu antinocicepção em camundongos com dor neuropática dependente da liberação central de opióides. Após 21 aplicações consecutivas, o LBI aumentou os níveis do fator de crescimento do nervo (NGF) e induziu a recuperação estrutural, aumentando o conteúdo mitocondrial e regulando a proteína Parkin no nervo isquiático de camundongos com NPD. Em conjunto, esses dados fornecem novos esclarecimentos sobre os mecanismos envolvidos na laserterapia, enfatizando seu potencial terapêutico no tratamento da NPD.

Palavras chaves: Dor. Laser de Baixa Intensidade. Neuropatia Diabética Periférica. Analgesia. Camundongo.

ABSTRACT

DA SILVA OLIVEIRA, V.R. **Estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na analgesia induzida por tratamento com laser de baixa intensidade na neuropatia periférica diabética experimental.** 2018. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Peripheral neuropathy (PN) caused by diabetes mellitus is one of the most common complications of diabetes, affecting about 50% of patients. Among the many symptoms of Diabetic Peripheral Neuropathy (DPN), stands out the development of chronic pain, which affects mainly the extremities, presenting itself as exacerbated responses to noxious stimuli (hyperalgesia) and as pain in response to light or not painful stimuli (allodynia). Conventional treatments available for neuropathy, including the associated pain, are still inadequate, unsatisfactory and benefit only a small number of patients. In clinical practice, the low level laser therapy (LLLT) becomes increasingly popular, once it promotes early nerve regeneration, resulting in significant improvement of motor and sensory disabilities caused by various types of lesions in peripheral nerves. Although the effects are satisfactory, the mechanisms by which these effects occur are still unknown. In this study, the effects of lasertherapy (660 nm, 30 mW, 1.6 J/cm², 15 sec, 0.28 cm²) on the treatment of DPN-induced pain and nerve damage was assessed in an experimental model of streptozotocin - induced diabetic neuropathy in mice. LLLT induced antinociception in neuropathic pain-mice dependent on the central release of opioids. After 21 consecutive applications, LLLT increased nerve growth factor (NGF) levels and induced structural recovery, increasing mitochondrial content and regulating Parkin in the sciatic nerve of mice with DPN. Together, these data provide further insights into the mechanisms involved in lasertherapy, emphasizing its therapeutic potential in the treatment of DPN.

Keywords: Pain. Low Level Laser therapy (LLLT). Diabetic Peripheral Neuropathy. Analgesia. Mouse.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema representativo do protocolo experimental utilizado nos experimentos	30
Figura 2	Figura ilustrativa dos Filamentos de Von Frey	31
Figura 3	Photon Lase III (DMC Equipamentos, São Carlos/SP, Brasil)	33
Figura 4	Efeito do LBI sobre os níveis de glicose sérica de camundongos diabéticos	38
Figura 5	Efeito do LBI sobre a alteração do peso corpóreo de camundongos diabéticos	39
Figura 6	Efeito do tratamento agudo com LBI sobre a sensibilidade mecânica dos camundongos, avaliada por filamentos de von Frey	41
Figura 7	Efeito do tratamento crônico com LBI sobre a sensibilidade mecânica dos camundongos, avaliada por filamentos de von Frey	42
Figura 8	Efeito da injeção de cloridrato de naloxona sobre a sensibilidade mecânica dos animais após 1 hora da aplicação do LBI, avaliada por filamentos de von Frey	44
Figura 9	Efeito da injeção de metiodato de naloxona sobre a sensibilidade mecânica dos animais após 1 hora da aplicação do LBI, avaliada por filamentos de von Frey	45
Figura 10	Efeito da injeção de cloridrato de naloxona sobre a sensibilidade mecânica dos animais após 21 aplicações de LBI, avaliados por filamentos de von Frey	46
Figura 11	Efeito da injeção de cloridrato de rimonabanto na sensibilidade mecânica dos animais após 1 hora da aplicação do LBI, avaliada por filamentos de von Frey	48
Figura 12	Efeito da injeção de cloridrato de rimonabanto sobre a sensibilidade mecânica dos animais após 21 aplicações de LBI, avaliada por filamentos de von Frey ...	49
Figura 13	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) do nervo isquiático de camundongos após 21 dias de tratamento com LBI	52
Figura 14	Espessura da mielina do nervo isquiático de camundongos após 21 dias de tratamento com LBI	53
Figura 15	Número de fibras C do nervo isquiático de camundongos após 21 dias de tratamento com LBI	54
Figura 16	Frequência da separação axoplasma-mielina do nervo isquiático de camundongos após 21 dias de tratamento com LBI	56
Figura 17	Número de mitocôndria do nervo isquiático de camundongos após 21 dias de tratamento com LBI	57
Figura 18	Efeito da laserterapia na expressão de VDAC2 e Parkin no nervo isquiático de camundongos diabéticos após 21 dias de tratamento com LBI	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros do LBI utilizado ao longo dos experimentos	33
Tabela 2	Concentração (pg/ml) de NGF no nervo isquiático de animais diabéticos tratados 21 dias com LBI	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Trifosfato
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (<i>Brain derived neurotrophic factor</i>)
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPME	Coluna Posterior da Medula Espinal
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP (<i>cAMP response element-binding protein</i>)
DRG	Gânglio da raiz dorsal (<i>Dorsal root ganglion</i>)
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular (<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>)
g	Grama
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina – 6
IP3K	Fosfoinositideo 3 quinase
J	Joule
LASER	<i>Light amplification stimulated by emission of radiation</i>
LBI	Laser de Baixa Intensidade
LIF	Fator de inibição de leucemia
M	Molar
MAPK	Proteino-quinase ativadas por mitógenos (Mitogen Activated Protein Kinases)
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mW	Miliwatt
NGF	Nerve Growth factor (Fator de Crescimento do Nervo)
NLX	Naloxona
nm	Nanômetro
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4	Neurotrofina 4
NP	Neuropatia Periférica
NPD	Neuropatia Periférica Diabética

PARKIN	E3 ubiquitina ligase (E3 ubiquitin ligase)
PLCg	Fosfolipase Cg
SR	SR141716A (Rimonabanto)
STZ	Estreptozotocina (Streptozotocin)
TGF- β	Fator de Transformação de crescimento beta
TNF- α	Fator de Necrose tumoral- alfa
TrKB	Tropomiosina quinase B (Tropomyosin receptor kinase B)
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
VDAC2	Proteína do canal seletivo de ânion dependente de voltagem 2 (Voltage-dependent anion-selective channel protein 2)
μ l	Microlitro
μ m	Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
δ	Delta
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
<	Menor
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	<i>Dor, nocicepção e neuropatia</i>	18
1.2	<i>Neuropatia Diabética</i>	21
1.3	<i>Laser de Baixa Intensidade</i>	25
2	HIPÓTESE	27
3	OBJETIVO	28
3.1	<i>Objetivos específicos</i>	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	<i>Delineamento Experimental</i>	29
4.2	<i>Animais</i>	30
4.3	<i>Indução do diabetes mellitus do tipo I-modelo experimental de neuropatia periférica diabética (NPD)</i>	31
4.4	<i>Avaliação da sensibilidade dolorosa</i>	31
4.5	<i>Tratamento com Laser de Baixa Intensidade</i>	32
4.6	<i>Tratamento farmacológico</i>	33
4.7	<i>Extração de proteínas</i>	34
4.8	<i>Elisa</i>	34
4.9	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão</i>	35
4.10	<i>Western Blotting</i>	35
4.11	<i>Análise estatística</i>	36
5	RESULTADOS	37
5.1	<i>O Tratamento com LBI não interfere com o aumento de glicemia e perda de peso observados após a injeção de STZ</i>	37
5.2	<i>O LBI reverte a sensibilidade mecânica aguda e crônica dos animais diabéticos ...</i>	40
5.3	<i>Receptores opióides periféricos estão envolvidos com a antinocicepção aguda mas não crônica induzida pelo LBI</i>	43
5.4	<i>Receptores canabinóides periféricos não estão envolvidos com a antinocicepção aguda e crônica induzida pelo LBI</i>	47
5.5	<i>Avaliação do efeito do LBI sobre os níveis de NGF</i>	50
5.6	<i>Tratamento com LBI induz melhora no estado geral dos neurônios de camundongos diabéticos</i>	51

5.7	<i>Tratamento com LBI induz alteração na homeostase mitocondrial do nervo isquiático de camundongos diabéticos</i>	58
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÃO	65
8	REFERÊNCIAS	66
9	APÊNDICE	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor, nocicepção e neuropatia

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a sensação dolorosa como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tais danos”. No entanto, uma recente atualização a descreveu como “uma experiência angustiante associada a danos reais ou potenciais aos tecidos, com componentes sensoriais, emocionais, cognitivos e sociais. Esta é subjetiva, e cada indivíduo aprende a utilizar este termo por meio de suas experiências” (WILLIAMS; CRAIG, 2016).

A dor age, portanto, como um sinal de alerta, sendo essencial para a manutenção da integridade dos tecidos. Uma vez que o organismo precisa permanecer sempre vigilante quanto a estímulos potencialmente prejudiciais, a dor age como forma de proteção contra ocasionais danos. Portanto, é essencial a existência de um sistema para detecção dos denominados estímulos nociceptivos (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

Os estímulos são detectados por terminações nervosas livres específicas para a dor, denominados nociceptores, presentes nas fibras nervosas periféricas, e, são transduzidos em potenciais de ação. A informação nociceptiva é, então, conduzida por esses neurônios de primeira ordem, que podem ser fibras C amielínicas ou fibras A δ mielinizadas em direção ao Sistema Nervoso Central (SNC). Os nociceptores, diferentemente de mecanoreceptores e termoreceptores, possuem um limiar de excitação elevado, característica que assegura sua ativação apenas frente a estímulos intensos, que podem ser de natureza mecânica, térmica ou química (GOZZANI, 2003; WOOLF; MA, 2007).

Os corpos celulares dos nociceptores localizam-se nos gânglios das raízes dorsais (DRG) da medula espinal. O estímulo é conduzido pelas fibras periféricas, que incidem na coluna posterior da medula espinal, onde fazem sinapse com um neurônio de segunda ordem na substância cinzenta da medula (PLEUVRY; LAURETTI, 1996). Esses neurônios de segunda ordem projetam-se para áreas superiores, ascendendo através de tratos específicos até o tálamo onde ocorre a recepção, integração e transferência do potencial nociceptivo para o córtex cerebral. Através de radiações talâmicas, a informação é emitida para diversas regiões do córtex somatossensorial e sistema límbico (BESSON, 1999; JABBUR; SAADÉ, 1999), resultando no fenômeno da nocicepção.

Há diferentes maneiras de se classificar a dor, podendo esta ser fisiológica ou patológica. A dor neuropática encontra-se nesse segundo grupo, surgindo após uma lesão ou patologia do sistema somatossensorial (IASP, 2017). Em nervos periféricos, lesões podem provocar no indivíduo uma sensação de dor severa e crônica (KAPUR, 2003). Caracterizando-se, sobretudo, por uma dor espontânea em forma de queimação, alodínia (dor em resposta a estímulos normalmente não dolorosos) e hiperalgesia (resposta exacerbada em resposta a estímulos dolorosos) (PAYNE, 1986). A lesão desencadeadora da dor neuropática pode ter diversas origens como trauma, infecção por vírus neurotrópico, uso de quimioterápicos, isquemia, tumores ou doenças metabólicas, como no caso do diabetes (DWORKIN, 2003; KAPUR, 2003; CAMPBELL; MEYER, 2006). Nem toda lesão na via nociceptiva gera, como consequência, dor (LI et al., 2000); entretanto, para a ocorrência da dor neuropática, a lesão deve estar, necessariamente, presente em neurônios na via (BOIVIE; LEIJON; JOHANSON, 1989).

Após uma lesão do nervo periférico, ocorrem mudanças profundas no SNC levando à sensibilização central, que atua como um amplificador de sinais periféricos (MEACHAM, 2017). A dor é capaz de gerar diversas mudanças químicas e estruturais na medula espinal (KAPUR, 2003). Posteriormente à lesão, podem ocorrer alterações patológicas nas fibras periféricas e na medula espinal, por exemplo, a ocorrência de impulsos ectópicos nas fibras lesionadas (DEVOR; WALL, 1990; GRACEY; LYNCH; BENNETT, 1992). Os danos aos axônios sensoriais podem desencadear a expressão de novos canais iônicos, que facilitam descargas ectópicas, resultando em dor espontânea (DEVOR; WALL; MELZACK, 1994).

As alterações da via sensitiva requerem a participação de mediadores químicos diversos, que provocam uma redução do limiar nociceptivo, contribuindo para uma maior responsividade e gerando um aumento da resposta a estímulos leves, contribuindo com o fenômeno de sensibilização periférica (FIELDS; HEINRICHER; MASON, 1991; ZIMMERMANN, 2001). Nesse processo, a micróglia desempenha um papel importante na iniciação, manutenção e mediação da dor neuropática. Após a lesão do nervo, as moléculas liberadas pelos neurônios contribuem para a ativação microglial, liberando interleucinas (IL) pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), as quais exercem significativas funções na continuidade da dor neuropática (CALVO; BENNETT, 2012; ZHAO, 2017).

A dor neuropática reduz drasticamente a qualidade de vida de um indivíduo. Apesar de sua alta prevalência (CRUCCU, 2004), os tratamentos disponíveis para a dor neuropática são

complexos e frequentemente ineficazes (ERICHSEN; BLACKBURN-MUNRO, 2002; ALEY; LEVINE, 2002; SAH, 2003; CALVO; DAWES; BENNETT, 2012). Uma melhor compreensão dos mecanismos responsáveis por esta dor contribuiria para o aperfeiçoamento das opções terapêuticas disponíveis, assim como para o surgimento de novas alternativas.

O tipo de abordagem terapêutica depende de cada paciente, uma vez que a dor é uma sensação complexa, de etiologia variada e fortemente influenciada por fatores cognitivos (CRUCCU, 2004). Dentre as terapias de escolha na prática clínica, destaca-se o uso de antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes, administração sistêmica de anestésicos locais, aplicação de agentes tópicos, administração de analgésicos narcóticos e não narcóticos (GALER, 1995; ATTAL, 2000; SAH, 2003), porém, até o momento, nenhum deles responde de maneira satisfatória, sendo que uma parcela importante de pacientes não apresenta alívio significativo da dor, independente da terapêutica utilizada. Desta maneira, o aprimoramento terapêutico em tais condições dolorosas se faz necessário.

1.2 Neuropatia Diabética

Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica de caráter multifatorial, caracterizada por hiperglicemia crônica e disfunções no metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas. É consequência de problemas na secreção e/ou ação da insulina e lesiona, a longo prazo, diversos órgãos, podendo, em última instância, provocar sua falência. Em casos extremos, na ausência de tratamentos, a cetoacidose e a hiperosmolaridade sanguínea podem levar ao coma e à morte (ALBERTI; ZIMMET, 1998).

A demanda metabólica dos neurônios por glicose é constante. Diferentemente de outras células, como hepatócitos e fibras musculares, os neurônios não estão adaptados ao metabolismo de ácidos graxos, e não se sustentam apenas com a captação de glicose pontual desencadeada pela sinalização da insulina. A nutrição dos neurônios é, portanto, diretamente proporcional aos níveis de glicose do meio extracelular. Quando o controle do quadro não é realizado de maneira adequada, o DM causa uma hiperglicemia severa, que é capaz de aumentar em até quatro vezes a concentração intracelular de glicose, alterando o balanço químico dos neurônios (TOMLINSON; GARDINER, 2008).

A mais frequente causa de neuropatia, em proporções mundiais, é o DM (SAID, 2007). Estima-se que, das 425 milhões de pessoas afetadas pelo diabetes (IDF, 2017), 60 a 70 % são acometidos por alguma forma de neuropatia ou desenvolverão a complicação em algum momento de sua vida. A neuropatia periférica diabética (NPD) é a manifestação mais usual, ocorrendo em cerca de 50% dos pacientes (BOULTON, 2005; FELDMAN, 2005, TOTH, 2010). Os pacientes relatam sintomas diversos – que incluem formigamento, perda de sensibilidade e fraqueza dos membros (VINCENT, 2011), mas, dentre eles, destaca-se o desenvolvimento de dor crônica, que afeta, principalmente, as extremidades, manifestando-se como alodínia e hiperalgesia.

Sabe-se que o controle glicêmico inadequado, assim como a duração do diabetes, são fatores diretamente correlacionados com o desenvolvimento da neuropatia periférica diabética (BOULTON, 2005), mas os mecanismos por trás do desenvolvimento da dor ainda são pouco claros (CHENG, 2010; TOTH, 2010).

Em pacientes diabéticos e em modelos experimentais, a NPD apresenta-se comumente como uma polineuropatia simétrica distal. Os distúrbios sensoriais se iniciam nas porções mais distais dos membros, como nos pés, e, ao longo do tempo, avançam para regiões mais proximais,

padrão que indica que o comprometimento ocorre primeiramente nas fibras mais longas (SAID, 2007). Foi observado em nervos periféricos de pacientes com NPD a presença de infiltrado inflamatório – composto de macrófagos e linfócitos T e B (DYCK; GIANNINI, 1996); degeneração axonal (THOMAS; TOMLINSON, 1993), desmielinização segmental em decorrência de disfunções das células de Schwann (JOHNSON, 1986), e menor capacidade da regeneração (CAMERON; COTTER, 1997). Consequentemente, observa-se uma redução da inervação epidermal, redução da amplitude nos potenciais de ação do nervo sensorial e menor velocidade de condução (JOHNSON; RYALS; WRIGHT, 2007).

As habilidades motoras e sensoriais dos pacientes acometidos pela NPD são significativamente comprometidas, e, portanto, esses indivíduos experimentam uma drástica redução na qualidade de vida (BARRET, 2007; CAO, 2010; RONDÓN, 2010; SAID, 2007). Não se estabeleceu um consenso preciso sobre os mecanismos envolvidos na hiperalgesia e alodínia na neuropatia periférica, mas relatos presentes na literatura demonstram que, posteriormente ao dano em axônios sensoriais, há um aumento da excitabilidade dos neurônios sensoriais de primeira ordem, os quais exercem um papel crítico no desenvolvimento da dor (HONG, 2004; JAGODIC, 2007).

Embora a degeneração nervosa, a hiperatividade dos neurônios, os déficits de fatores neurotróficos e a isquemia decorrente de distúrbios vasculares tenham sido apontados como responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção da NPD, as terapias disponíveis até o momento são ainda pouco efetivas, conferindo o alívio da dor apenas para uma pequena parcela de pacientes (BARRET, 2007; BOULTON, 2005; TESFAYE; KEMPLER, 2005; VINIK, 1999).

A grande maioria dos tratamentos farmacológicos destinados à NPD é direcionada ao bloqueio da neurotransmissão – como é o caso dos antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes, o que, em geral, limita sua eficácia, visto que diversos mediadores inflamatórios continuam presentes, sensibilizando e ativando os neurônios da via nociceptiva.

A hiperglicemia crônica resultante do diabetes provoca alterações metabólicas que levam a um desequilíbrio no controle da secreção de citocinas como IL-6, IL-1 β , TNF- α , fator de inibição de leucemia (LIF) e fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), os quais atuam na regulação do equilíbrio nos nervos periféricos, sugerindo uma participação desses mediadores na fisiopatologia da NPD (SKUNDRIC; LISAK, 2003).

O TNF- α é apontado como um mediador capaz de induzir uma resposta inflamatória severa. Na NPD estudos mostraram níveis elevados de TNF- α (GONZÁLEZ-CLEMENTE, 2005; ALCANTARA, 2013), sendo os macrófagos e células de Schwann os principais responsáveis pela expressão endoneural dessa citocina. Biópsias feitas a partir de nervos de pacientes diabéticos com neuropatia dolorosa apresentam níveis aumentados de TNF- α , em células de Schwann (EMPL, 2001). Nesse sentido, existem estudos visando a inativação do TNF- α obtiveram resultados positivos no prognóstico da NPD, ressaltando um possível papel para essa citocina no desenvolvimento e manutenção da NPD (YAMAKAWA, 2011; SAGARA, 1996).

Outro possível contribuinte para o desenvolvimento da neuropatia diabética é a ausência de suporte neurotrófico (ANDREASSEN, 2009). Muitas das alterações neuronais no diabetes podem ser replicadas pela depleção experimental específica de neurotrofinas, seus receptores e proteínas ligantes. Em modelos experimentais de diabetes existe uma redução na viabilidade desses fatores, o que pode ser uma consequência das anormalidades metabólicas ou ainda independentes do controle glicêmico (PITTENGER; VINIK, 2003).

Os fatores neurotróficos são produzidos por neurônios, células de Schwann e órgãos finais no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), compreendendo um grupo heterogêneo de moléculas, que contribuem durante o desenvolvimento neuronal precoce e promovem a sobrevivência e regeneração em adultos (DAWBARN; ALLEN, 2003). A família de neurotrofinas consiste em fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3) e neurotrofina 4 (NT-4) (PITTS, 2006). Dentre essas, destacam-se NGF e BDNF, pois ambas desempenham um papel importante na sobrevivência, crescimento e diferenciação neural (DE OLIVEIRA MARTINS, 2013).

O NGF está envolvido no desenvolvimento, manutenção e regeneração de nervos sensoriais e simpáticos (WANG, 2006). Tem sido estudado há muito tempo o uso de fatores de crescimento como o NGF em relação à lesão neural, sendo este capaz de estimular a resposta ao reparo do nervo (RAGHOEBAR, 2007). BDNF é um potente fator de sobrevivência, que também tem sido implicado em uma variedade de condições fisiopatológicas (ALMEIDA, 2005), normalmente é expresso e sintetizado em alguns neurônios de tamanho pequeno e médio do DRG e pode ser liberado para apoiar o desenvolvimento neuronal ou participar da percepção

e sensibilização da dor (MALCANGIO; LESSMANN, 2003; ERNSBERGER, 2009; GENG, 2010).

Não há, até o momento, um tratamento disponível totalmente eficaz para os pacientes acometidos pela NPD; entretanto, a melhor maneira de evitá-la é através da manutenção de um ótimo controle glicêmico. A neuropatia periférica é a complicação de longa duração mais comum no diabetes, sendo extremamente incapacitante para pacientes (SAID, 2007). Dessa forma, embora existam avanços no desenvolvimento de novos analgésicos, a meta de se encontrar novos agentes terapêuticos, capazes de reverter a sensação dolorosa anormal sem afetar as demais capacidades normais dos indivíduos, está longe de ser alcançada.

Recentemente, novas ferramentas terapêuticas têm sido levantadas como potenciais formas de tratamento para diversas lesões nervosas. Com o intuito de promover uma maior velocidade de regeneração dos nervos, a literatura menciona práticas como a estimulação elétrica (DIMOV, 2017) e o laser de baixa intensidade (KHAMSEH, 2011).

1.3 Laser de Baixa Intensidade

A palavra Laser é a abreviatura de “*Light Amplification Stimulated by Emission of Radiation*”. Trata-se de uma forma de radiação não-ionizante altamente concentrada, que apresenta algumas diferenças em relação a outras fontes luminosas, incluindo características como a monocromaticidade e a colimação (luz composta de ondas em mesma frequência e direção) (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; BAXTER, 1997; TUNNER; HODE, 2002).

O laser, ao incidir em uma superfície, fornece uma quantidade elevada de fótons que, ao atingirem seu alvo, podem ser refletidos, dispersos, transmitidos ou absorvidos pelo meio. Nos tecidos, por exemplo, o laser pode ser absorvido em diferentes camadas, de acordo com os diferentes constituintes. Esta absorção promove uma interação entre a radiação laser e as estruturas celulares e moleculares dos tecidos, evento ao qual se atribui o efeito terapêutico (BRUGNERA; PINHEIRO, 1998; GENOVESE, 2000; MELLO; MELLO, 2001).

Classifica-se a terapia de laser como de baixa intensidade quando a potência de radiação varia entre 5 e 500mW. Considera-se, portanto, que os eventos biológicos desencadeados pelo uso do laser de baixa intensidade (LBI) não são decorrentes de efeitos térmicos, uma vez que esses se manifestam apenas com potências maiores do que 1W (MESTER, 2013).

Os LBI são conhecidos por suas ações biomoduladoras, analgésicas e anti-inflamatórias sobre tecidos diversos, reduzindo edemas, controlando processos inflamatórios, aumentando a fagocitose, estimulando a síntese de colágeno e promovendo regeneração tecidual (MELLO; MELLO, 2001; ORTIZ, 2003).

Apesar da terapia de LBI apresentar resultados positivos em lesões em tecidos diversos (WALSH, 1997; ROCHKIND, 2007; KHAMSEH, 2011), os mecanismos pelos quais a energia luminosa é convertida em efeitos bioquímicos, gerando analgesia e regenerando tecidos, ainda necessitam de maior esclarecimento.

Relatos da literatura atribuem os efeitos biológicos do LBI à ação dos fótons sobre certas organelas celulares, como as mitocôndrias, desencadeando um aumento na velocidade e eficiência da síntese de ATP e modificações no transporte iônico (KLEBANOV, 2001). É possível, ainda, que sua ação se estenda a fotorreceptores sensíveis a determinados comprimentos de onda, que absorvem os fótons e desencadeiam reações químicas, por exemplo, modulando o processo de transcrição gênica (PASSARELLA, 1984; KARU, 1989), além de

promover o aumento de endorfina circulante (beta endorfina), proporcionando o efeito analgésico na dor não- inflamatória. (CAMPANA, 1998).

O LBI é também capaz de estimular a microcirculação local e a proliferação celular, favorecendo ainda mais os eventos de reparo tecidual (ROCHKIND, 2001; SHAMIR, 2001). No geral, os efeitos terapêuticos do laser de baixa intensidade incluem: aceleração da cicatrização (AMORIM, 2006; GÁL, 2008), redução da sintomatologia dolorosa (ALBREKTSSON; HANSSON, 1986), restauração da função neural posterior à lesão, aceleração do remodelamento e reparo ósseo, normalização da função hormonal, estimulação de liberação de endorfina e modulação do sistema imune, modulação dos níveis de NGF e BDNF (WALSH, 1997; ROCHKIND, 2007; HASHMI, 2010, DE OLIVEIRA MARTINS, 2013).

No que se refere à neuropatia diabética, foi demonstrado que o tratamento com LBI é capaz de melhorar a velocidade de condução nervosa de pacientes diabéticos com polineuropatia distal (KHAMSEH, 2011). Experimentalmente, foi demonstrado que o tratamento com LBI, induz aumento na proliferação de fibroblastos de ratos diabéticos (MIRZAEI, 2007).

O controle da dor é realizado por diversos mecanismos endógenos, tanto ao nível do sistema nervoso central, quanto em níveis periféricos. Nesse sentido, os opióides constituem um importante mecanismo de controle endógeno da dor.

Os opióides endógenos são peptídeos que se ligam a receptores específicos. Foram caracterizadas três famílias de ligantes, que se originam em três genes distintos e geram três polipeptídeos: a pró-enkefalina, a pró-opiomelanocortina e a pró-dinorfina (AKIL, 1984).

Após processamento desses precursores, são geradas enkefalinas, endorfinas e dinorfinas que interagem com receptores opióides - do tipo mu(μ), kappa(κ) ou delta(δ), gerando efeito biológico (STEIN, 1995). Nesse sentido, foi demonstrado que o LBI induz analgesia em ratos, mediada pelo aumento da produção de opióides endógenos (HAGIWARA, 2007), reforçando a hipótese de que o tratamento com LBI possa ser uma ferramenta importante para o tratamento da NPD.

2 HIPÓTESE

Considerando a necessidade do desenvolvimento de terapias mais efetivas para o tratamento da dor associada à NPD e considerando os estudos que demonstram os efeitos do LBI sobre a inflamação e feridas associadas ao diabetes, é plausível sugerir que o LBI seja capaz de induzir analgesia por reestabelecer os níveis de fatores neurotróficos, bem como a morfologia axonal dos nervos periféricos.

3 OBJETIVO

Frente ao exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial terapêutico do LBI sobre a sensibilidade dolorosa em modelo de NPD induzida por estreptozotocina (STZ) em camundongos C57Bl6, bem como possíveis mecanismos envolvidos no seu efeito.

3.1. Objetivos Específicos

- i) Estabelecer o modelo de neuropatia periférica em camundongos submetidos ao diabetes tipo 1 por injeção de estreptozotocina (STZ);
- ii) Avaliar o efeito do tratamento com LBI sobre a sensibilidade dolorosa mecânica dos camundongos diabéticos, por de filamentos de von Frey;
- iii) Avaliar o envolvimento periférico e central de opióides e/ou canabinóides na analgesia induzida pelo LBI;
- iv) Avaliar por ELISA o efeito do tratamento com LBI sobre os níveis do fator de crescimento no nervo (NGF) nos nervos isquiáticos de animais diabéticos;
- v) Avaliar, por microscopia eletrônica de transmissão, o efeito do tratamento com LBI sobre a morfologia do nervo isquiático de camundongos com diabetes do tipo 1;
- vi) Avaliar, por western blotting, o efeito do tratamento com LBI sobre a homeostase mitocondrial do nervo isquiático de camundongos diabéticos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Delineamento Experimental*

O diabetes mellitus do tipo I foi induzido nos animais por meio de uma injeção intraperitoneal (i.p.) única de estreptozotocina (STZ; 225mg/Kg; Sigma). No sétimo dia após a injeção de STZ, foi verificada a glicemia dos animais. O sucesso na indução do diabetes foi confirmado pela ocorrência de hiperglicemia sanguínea (medidos em sangue da cauda utilizando-se tiras de teste ACCU-CHEK Roche Diagnostics - hiperglicemia ≥ 16 mmol/l ou 300 mg/dl – normal 5-8 mmol/l) e apenas os animais classificados diabéticos foram mantidos nos experimentos subsequentes. Uma vez diabéticos, os animais foram avaliados quanto à sensibilidade dolorosa, pelo teste mecânico (filamentos de von Frey), a fim de se verificar a presença de alterações na sensibilidade dolorosa causada pelo acometimento periférico (neuropatia diabética). Os animais que apresentaram alterações na sensibilidade dolorosa foram então submetidos a sessões de tratamento com laser de baixa intensidade (LBI) diariamente por 7 ou 21 dias e foram novamente avaliados quanto à sensibilidade dolorosa. Animais controle receberam injeção de salina e foram submetidos aos mesmos protocolos experimentais. Semanalmente, foi verificado o peso, a glicemia dos animais e a taxa de mortalidade. Para se verificar a participação de opióides e/ou canabinóides frente ao efeito analgésico do LBI nos animais diabéticos, foram feitos tratamentos farmacológicos com Naloxona (antagonista do receptor opióide) e Rimonabanto (SR141716A – agonista inverso do receptor canabinóides 1) após a 1ª e última aplicação do LBI. A avaliação do grau de desmielinização, verificação da morfologia axonal, concentração de NGF e avaliação da homeostase mitocondrial foram realizadas em amostras de nervo isquiático extraídas no 21º dia de tratamento com LBI. Para a realização dos experimentos os animais foram divididos nos diferentes grupos, como se segue: Grupo 1 – Salina + Laser desligado (Sal NT), Grupo 2 – Salina + Laser (controle)-(Sal+L), Grupo 3 - STZ + Laser desligado (sham)- (STZ NT) e Grupo 4 – STZ + Laser (STZ+L). Grupos distintos de animais foram utilizados para os ensaios de microscopia, ELISA e WB, uma vez que para a microscopia os animais foram perfundidos para fixação dos tecidos e para o teste de ELISA e WB foi utilizado o material a fresco. Ainda foram utilizados grupos distintos para os ensaios de 7 e 21 dias (Figura 1).

Figura 1. Esquema representativo do protocolo experimental utilizado nos experimentos.

Fonte: autor (2018).

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57Bl/6, machos, entre 20g e 26g, com 8 semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Departamento de Anatomia e foram mantidos em local apropriado, com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro e escuro (12/12 horas), com água e ração ad libitum (exceto 4 horas antes da injeção de estreptozotocina, para diminuir a interferência da ação da injeção), por um período mínimo de três dias antes de serem utilizados nos experimentos. Para a realização dos experimentos, os animais foram manipulados considerando-se os princípios determinados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA - Protocolo nº 22/2014) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Após os experimentos, os animais foram eutanasiados e descartados, segundo os procedimentos de rotina do laboratório.

4.3 Indução do diabetes mellitus do tipo I - modelo experimental de neuropatia periférica diabética (NPD)

A estreptozotocina (STZ) causa a degeneração das células beta de Langerhans no pâncreas, induzindo o diabetes mellitus do tipo I (CHENG, 2015). Os camundongos receberam injeção única intraperitoneal de STZ (225mg/Kg; Sigma), dissolvida em salina estéril 0.9%, após restrição alimentar de 4 h (DAVIDSON, 2010; COPPEY, 2011). O diabetes foi confirmado nos camundongos tratados com STZ por medidas de glicose sanguínea. Os níveis de glicose foram medidos a partir do sangue da cauda utilizando-se tiras de teste ACCU-CHEK (Roche Diagnostics - hiperglicemia ≥ 16 mmol/l ou 300 mg/dl – normal 5-8 mmol/l) semanalmente ao longo de todo período experimental. Os animais que não apresentaram diagnóstico para o diabetes foram excluídos. A dor neuropática nos camundongos foi confirmada pela avaliação dos limiares nociceptivos mecânicos no 14º dia após a indução do diabetes, utilizando-se filamentos de von Frey.

4.4 Avaliação da sensibilidade dolorosa

A avaliação da sensibilidade ao estímulo mecânico baseou-se no método de CHAPLAN e colaboradores (1994) onde foram utilizados filamentos von Frey que consistem em filamentos de nylon de diferentes diâmetros responsáveis por empregar diferentes intensidades de força. Tal teste consiste em um conjunto de nove filamentos que foram aplicados sobre a região plantar da pata posterior esquerda de cada animal.

Figura 2. Figura ilustrativa dos Filamentos de Von Frey.

Fonte: Valéria Dias (2015).

Os filamentos utilizados foram: 0.07g, 0.16g, 0.4g, 0.6g, 1.0g, 1.4g, 2.0g, 4.0g, 6.0g. Sendo que o limiar de retirada da pata foi determinado pelo aumento ou diminuição sequencial da força. O teste foi iniciado sempre com o filamento de 1.0g e a contagem de respostas foi iniciada quando a primeira resposta foi negativa e a segunda positiva. A partir desta resposta negativa/positiva, foram registradas mais quatro respostas, respeitando-se sempre o princípio de que uma resposta positiva é sempre seguida por um estímulo (filamento) inferior ao anterior, enquanto que uma resposta negativa é sempre seguida por um estímulo (filamento) superior ao anterior. Uma resposta foi considerada positiva quando o animal retirou a pata ao estímulo mecânico, e negativa quando o animal não apresentava reação alguma. O limiar de retirada da pata do animal foi analisado observando os padrões de respostas, onde estes padrões foram inseridos no cálculo a seguir: $50\% g = 10 [X_f + K \cdot \gamma]$.

Sendo que: X_f é o valor do último filamento em gramas que é convertido em log de base 10; K : é o valor da sequência de seis respostas as quais os dados foram retirados da tabela (CHAPLAN, 1994); e γ : é a média da diferença (em log) entre os filamentos apresentados.

4.5 Tratamento com laser de baixa intensidade

O tratamento foi realizado com a utilização do laser de baixa intensidade (LBI), semiconductor (InGaAlP, modelo Photon Lase III, D.M.C., São Carlos, S.P. Brasil). Os parâmetros de laser utilizados foram baseados em trabalhos da literatura que demonstram que neste comprimento de onda é possível se induzir antinocicepção em ratos submetidos a diferentes modelos de neuropatia periférica (JANZADEH, 2016; MASOUMIPOOR, 2014; HSIEH, 2012). O Laser foi utilizado com sua respectiva ponteira, aplicado diariamente, 1 vez ao dia, na pata posterior esquerda nos animais portadores de NPD. Nos animais controle (SAL NT e STZ NT) o laser foi desligado, no entanto seguimos o mesmo protocolo.

Tabela 1. Parâmetros do LBI utilizado ao longo dos experimentos.

Parâmetros Laser	
Frequência	contínua
Comprimento de onda (nm)	660
Densidade de energia (J/cm ²)	1,6
Densidade de potência (mW/cm ²)	107,14
Potência (mW)	30
Tempo (segundos)	15
Área Irradiada (cm ²)	0,28

Fonte: autor (2018).

Figura 3. Photon Lase III (DMC Equipamentos, São Carlos/SP, Brasil). Emissão de luz laser com comprimento de onda de 660 nm e de 808 nm para bioestimulação nas áreas de odontologia, medicina geral e fisioterapia.

Fonte: DMC Equipamentos, São Carlos/SP, Brasil (2018).

4.6 Tratamento Farmacológico

O cloridrato de naloxona (NLX; 10 mg/Kg, i.p.; Tocris Bioscience- Número CAS 357-08-4), um antagonista inespecífico de receptores opióides, foi dissolvido em salina estéril 0,9% e injetado em dois protocolos distintos. Para avaliação da participação de opióides no efeito agudo do LBI, a injeção foi realizada meia hora após a primeira aplicação do LBI, para que o pico de atividade do fármaco (30 min após injeção) correspondesse ao pico analgésico observado do LBI (1 h da primeira aplicação). Já para o estudo da participação de opióides endógenos no efeito crônico do LBI, a NLX foi injetada após 21 sessões de LBI, e o teste de sensibilidade mecânica foi realizado após 30 min da injeção do antagonista.

O metiodato de naloxona (NLX MET, 10 mg / kg, i.p.; Sigma - Número CAS 93302-47-7), é também um antagonista não seletivo de receptores opióides, que não atravessa a barreira

hematoencefálica, ou seja ele tem acesso limitado ao cérebro permitindo a avaliação da sua ação via sistema nervoso periférico ou central (LEWANOWITSCH; IRVINE, 2003). Foi dissolvido em solução salina estéril 0,9% e injetado sob o mesmo protocolo de NLX supracitada, para avaliação da participação de opióides no efeito agudo do LBI.

O cloridrato de rimonabanto (SR141716A, 1 mg/kg, i.p.; Tocris Bioscience® - cod: 0923), um agonista inverso do receptor canabinóide do tipo 1 (DIMOV, 2017), foi dissolvido em DMSO 80% e injetado em dois protocolos distintos. Para avaliação da participação de canabinóides no efeito agudo do LBI, a injeção foi realizada 20 min após a primeira aplicação do LBI, para que o pico de atividade do fármaco (40 min após injeção) correspondesse ao pico analgésico observado do LBI (1 h da primeira aplicação). Já para o estudo da participação de canabinóides endógenos no efeito crônico do LBI, o rimonabanto foi injetado após 21 sessões de LBI, e o teste de sensibilidade mecânica foi realizado após 40 min da injeção do fármaco.

4.7 Extração de proteínas

Amostras de nervo isquiático foram dissecadas a fresco e acondicionados em tubos mantidos em gelo seco. Posteriormente foi adicionado 100 µl do tampão de lise contendo 137 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8, 1% de NP-40, 0.105% de SDS, 10% de glicerol e inibidores de proteases (PMSF, aprotinina e leupeptina) e fosfatases (NaF, Na₂VnO₄), sendo então homogeneizadas. O homogenato foi centrifugado a 10.000xg por 15 minutos (4°C) e o sobrenadante transferido para um novo tubo, o qual foi armazenado a -80°C até a utilização de uma pequena quantidade (10ul) para a realização da quantificação de proteínas totais e o restante utilizado para o ELISA. A quantificação de proteínas totais foi realizada com kit DC-ProteinAssay (BioRad) de acordo com instruções do fabricante.

4.8 Elisa

Os ensaios foram realizados para avaliação da concentração de NGF (em amostras de nervo isquiático) coletados de camundongos submetidos a 21 sessões de LBI. A partir dos sobrenadantes foi feita a quantificação de proteína total de cada amostra (leitura em 750 nm), para, posteriormente, submetê-las aos ensaios de ELISA. Para tanto foi utilizado o kit de ELISA (NGF Emax ImmunoAssay System, Promega, USA) de acordo com as instruções do fabricante (leitura em 450 nm).

4.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Amostras do nervo isquiático foram coletadas dos animais controle (submetidos à injeção de salina) e dos animais diabéticos (submetidos à injeção de STZ), tratados ou não com 21 sessões diárias de laser, os quais, após serem anestesiados (40 µl de ketamina e 20 µl de xilazina), foram submetidos à perfusão transcardíaca com paraformaldeído 2% e imediatamente imersas em solução fixadora de Karnovsky modificada, por um período de 2 h. Após a fixação, as amostras foram lavadas em tampão fosfato 0,1 M e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1% por 2 h a 4°C. Após este procedimento foram novamente lavadas em solução salina e adicionadas de acetato de uranila a 0,5% overnight sendo em seguida desidratadas em concentrações seriadas de álcool (70°, 80°, 90° e 95°) de 15 min cada e 4 lavagens em etanol absoluto de 15 min, mais 2 banhos de óxido de propileno de 15 min cada. Após esses banhos foi realizada a inclusão em resina e óxido de propileno na proporção de 1:1 (Spurr: óxido de propileno) por um período de 1 h, trocou-se para 3:1 por 1:30 h, em seguida por resina pura overnight, sempre no misturador rotatório. Ao término desse processo foi feita a inclusão do material, o qual permaneceu na estufa por 3 dias a 60°C. Passado esse período, preparou-se o bloco para a trimagem e realizaram-se os cortes semifinos (350 nm) corados com azul de toluidina, após a observação ao microscópio óptico, efetuou-se os cortes ultrafinos (60 nm), posteriormente contrastados com acetato de uranila, lavado com água e em seguida contrastados com citrato de chumbo seguida de uma nova lavagem. Após a secagem foram feitas fotografias do tecido em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1010, fazendo-se a varredura de toda a tela (200 mesh). Foi utilizado o programa image J para a análise das imagens, onde foi avaliado o dano causado aos nervos periféricos, o padrão morfológico axonal, mielina e conteúdo citoplasmático.

4.10 Western Blotting

Para as análises de Western blotting, obteve-se um total de 18 amostras, sendo selecionados 6 camundongos de cada grupo (Sal, STZ NT, STZ+L). Amostras do nervo isquiático esquerdo de animais controle ou diabéticos, tratados ou não com LBI foram extraídas e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo em seguida, lisadas em tampão de extração (0.625% Nonidet P-40, 0.625% [W/V] deoxicolato de sódio; 0.00625M Fosfato de sódio pH 7.2, 1mM EDTA pH 8 e para o procedimento de extração foi adicionado inibidores de fosfatase e

protease), utilizando sonificador (amplitude de 75%). A quantidade de proteínas foi determinada pelo método Bradford (Bio-Rad). Subsequentemente, 50 µg de proteína foi submetido a eletroforese em 10% de SDS-PAGE e transferido para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada com solução de TBS-T (0,1 % Tween 20) com BSA 5% por 1 hora em temperatura ambiente e subsequentemente, incubada com solução de bloqueio (BSA 5% em TBS-T) com os anticorpos primários Parkin (AB 179812) (1:1000), Vdac2 (AB37985) (1:1000), β-Tubulina (2146s) (1:2000), overnight a 4°C. Os anticorpos secundários (Donkey-antigoat igG, Goat-antirabbit igG) foram incubados em solução de TBS-T em uma concentração de 1:30000 por 1 hora. A análises de densitometria foram obtidas com o software VisionCapt.

4.11 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média±erro padrão da média (e.p.m). Os resultados dos testes comportamentais foram analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni para detecção das diferenças das médias, e/ou teste t não pareado. O índice de significância considerado foi de $p < 0,05$. Calculado com software GraphPad Prism/GraphPad Software V6.00-Copyright ©, 1992-2007.

5 RESULTADOS

5.1 O Tratamento com LBI não interfere com o aumento de glicemia e perda de peso observados após a injeção de STZ

A figura 4 mostra que animais injetados com STZ (21 dias, STZ NT, média: $402,88 \pm 28,77$, $n=9$; STZ+L, média: $379,14 \pm 30,17$, $n=7$) tiveram um aumento significativo na concentração de glicose sanguínea em relação aos animais controle (21 dias - Sal NT, média: $144,62 \pm 3,79$, $n=8$; SAL+L, média: $164,55 \pm 10,93$, $n=9$, $p<0,0001$). Esse aumento foi detectado 7 dias após a injeção de STZ, e se manteve durante todo o período experimental. O tratamento com o laser não interferiu com o aumento da glicose sanguínea nos animais diabéticos, da mesma maneira que não alterou a glicemia dos animais controle.

Os animais foram pesados semanalmente durante o período experimental (Figura 5). Foi possível observar uma perda de peso progressiva nos grupos STZ NT (21 dias, média: $18,62 \pm 0,94$, $n=10$, $p<0,0001$) e STZ+L (21 dias, média: $18,74 \pm 1,27$, $n=10$, $p<0,0001$). Os grupos controle (Sal NT e Sal+L) não tiveram nenhum comprometimento no ganho de peso.

Figura 4. Efeito do LBI sobre os níveis de glicose sérica de camundongos diabéticos. A glicemia foi medida antes de qualquer procedimento (tempo 0), 7 e 14 dias após a injeção de STZ ou SAL (tempo 7 e 14, respectivamente) e após 7 e 21 dias de LBI (cronologicamente, 21 e 35 dias após a indução do diabetes). Os dados correspondem à média $\pm$ e.p.m dos animais por grupo. **** $p < 0,0001$ grupo STZ NT; ##### $p < 0,0001$ grupo STZ+L em comparação com os grupos SAL NT e SAL+L (ANOVA de duas vias, seguido de pós teste de Bonferroni).

Fonte: autor (2018).

Figura 5. Efeito do LBI sobre a alteração do peso corpóreo de camundongos diabéticos. Os animais foram pesados antes de qualquer procedimento (tempo 0), 7 e 24 dias após a injeção de STZ ou Sal (tempo 7 e 14, respectivamente) e após 7 e 21 dias de LBI (cronologicamente, 21 e 35 dias após a indução do diabetes). Os dados correspondem à média $\pm$ e.p.m. dos animais por grupo. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ grupo STZ NT; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ grupo STZ+L em comparação com os grupos SAL NT e SAL+L (ANOVA de duas vias, seguido de pós-teste de Bonferroni).

Fonte: autor (2018).

5.2 O LBI reverte a sensibilidade mecânica aguda e crônica dos animais diabéticos

Uma vez padronizado o modelo de neuropatia diabética os animais foram submetidos a 21 sessões diárias de LBI sendo a sensibilidade dolorosa avaliada 1, 3, 6 e 24 horas, após a primeira aplicação e também após 7 e 21 aplicações. Os resultados obtidos demonstram que os animais dos grupos STZ apresentaram uma diminuição do limiar nociceptivo, em todos os tempos avaliados (Figuras 6 e 7). Ainda, o tratamento com LBI não interferiu na sensibilidade dos animais tratados com salina. Quando aplicado nos animais com dor neuropática, o LBI foi capaz de induzir antinocicepção, sendo que no tratamento agudo este efeito foi observado na 1^a hora de avaliação (STZ+L, média: $0,93 \pm 0,19$, $n=11$, $p=0,0024$) decaindo nos tempos subsequentes (Figura 6) e no tratamento crônico permaneceu em todo período experimental (21 dias, STZ+L, média: $0,811 \pm 0,120$, $n=12$, $p=0,0112$) (Figura 7).

Figura 6. Efeito do tratamento agudo com LBI sobre a sensibilidade mecânica dos camundongos, avaliada por filamentos de von Frey. Os animais foram avaliados antes de qualquer procedimento (Tempo 0), 14 dias após a injeção de STZ (tempo 14) e após 1h, 3h, 6h e 24h do LBI. Os dados correspondem à média $\pm$ e.p.m dos grupos. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$, grupo STZ NT em comparação com o grupo Sal NT; ## $p<0,01$ grupo STZ+L em comparação com o grupo STZ NT (ANOVA de duas vias, seguido de pós-teste de Bonferroni).

Fonte: autor (2018).

5.3 Receptores opióides periféricos estão envolvidos com a antinocicepção aguda mas não crônica induzida pelo LBI

Para investigar o envolvimento de opióides na antinocicepção induzida pelo LBI, camundongos diabéticos foram tratados com cloridrato de naloxona (NLX) após a laserterapia. Os resultados expressos na figura 8 demonstram que o tratamento com NLX foi capaz de reverter a antinocicepção induzida pela laserterapia observada (STZ+L+NLX, média: $0,086 \pm 0,012$, $n=6$, $p=0,0002$), sugerindo o envolvimento de opióides no efeito agudo do LBI. A injeção de NLX por si só não alterou a sensibilidade mecânica do grupo STZ NT+NLX ($n=5$) (Figura 8).

A fim de se avaliar se este efeito agudo seria dependente de mecanismos centrais ou periféricos, um grupo de camundongos diabéticos recebeu metiodeto de naloxona (NLX MET) antes do tratamento com LBI. Os resultados demonstram que o NLX MET não foi capaz de reverter a antinocicepção induzida por LBI quando comparado com o grupo controle, que não recebeu naloxona (1h – STZ NT: $0,412 \pm 0,154$, $n=4$; STZ+L: $1,177 \pm 0,120$, $n=5$; STZ+L+NLX MET: $1,415 \pm 0,365$, $n=5$; $p>0,9999$) confirmando assim que a antinocicepção induzida pela laserterapia em camundongos diabéticos depende da liberação central de opióides (Figura 9).

Por outro lado, quando a NLX foi injetada em animais submetidos ao tratamento crônico com LBI (STZ+L+NLX; $1,669 \pm 0,389$, $n=3$) não foi observada reversão da antinocicepção quando comparado ao grupo controle de animais (STZ+L, $1,199 \pm 0,200$, $n=4$) (Figura 10), mostrando que o envolvimento de opióides é restrito ao efeito agudo do LBI.

Figura 8. Efeito da injeção de cloridrato de naloxona sobre a sensibilidade mecânica dos animais após 1 h da aplicação do LBI, avaliada por filamentos de von Frey. Os animais foram avaliados antes de qualquer procedimento (Tempo 0), o cloridrato de naloxona (NLX; 10 mg/kg) foi injetado por via intraperitoneal no 14º dia após injeção de STZ, 30 min. antes da aplicação do LBI. O teste comportamental foi realizado 1 h após a aplicação do LBI. Os dados correspondem à média $\pm$ e.p.m dos grupos. ###p=0,0002, STZ+L em comparação com o grupo STZ+L+NLX (ANOVA de duas vias, seguido de pós teste de Bonferroni).

Fonte: autor (2018).

Figura 9. Efeito da injeção de metiodato de naloxona sobre a sensibilidade mecânica dos animais após 1 hora da aplicação do LBI, avaliada por filamentos de von Frey. Os animais foram avaliados antes de qualquer procedimento (Tempo 0), o Metiodeto de naloxona (NLX MET; 10 mg/kg) foi injetado intraperitonealmente no 14º dia após injeção de STZ, 30 min. antes da aplicação do LBI. O teste comportamental dos filamentos de von Frey foi realizado 1 hora após a aplicação do LBI. Os dados correspondem à média $\pm$ e.p.m dos grupos. * $p < 0,05$, STZ+L+NLX MET comparado ao grupo STZ NT (ANOVA de duas vias, seguido de pós teste de Bonferroni).

Fonte: autor (2018).

Figura 10. Efeito da injeção de cloridrato de naloxona sobre a sensibilidade mecânica dos animais após 21 aplicações de LBI, avaliados por filamentos de von Frey. O Cloridrato de naloxona (NLX; 10 mg/kg) foi injetado no 21º dia, 1h antes da última aplicação de LBI. A sensibilidade mecânica foi avaliada por von Frey 1h após a última aplicação do LBI. Os dados correspondem à média $\pm$ e.p.m dos grupos. ## $p<0,01$ e *** $p<0,001$, STZ+L e STZ+L+NLX em comparação com o grupo STZ NT e STZ NT+NLX (ANOVA de duas vias, seguido de pós teste de Bonferroni).

Fonte: autor (2018).

5.4 Receptores canabinóides periféricos não estão envolvidos com a antinocicepção aguda ou crônica induzida pelo LBI

Uma vez que não foi observada a participação de opióides na antinocicepção induzida pelo efeito crônico com LBI, decidimos investigar se esse efeito não seria mediado pelo o envolvimento de receptores canabinóides, visto que este está envolvido numa via semelhante, agindo de maneira distinta, mas paralela àquela que envolve opióides (IVERSEN & CHAPMAN, 2002). Portanto, camundongos diabéticos foram tratados com o agonista inverso do receptor canabinóide do tipo 1 (SR141716A / cloridrato de rimonabanto) após o LBI. Os resultados expressos na Figura 11 demonstram que o tratamento com SR141716 20 min após a primeira aplicação de LBI não foi capaz de reverter a antinocicepção induzida pelo LBI (1h-STZ+L: $1,989 \pm 0,443$; n=3; STZ+L+SR= $2,596 \pm 0,024$; n=3; p=0,2393) e o mesmo efeito foi observado na antinocicepção induzida pelo efeito crônico do LBI (STZ+L: $2,444 \pm 0,320$; n=3; STZ+L+SR= $2,921 \pm 0,249$; n=4; p=0,4758 - Figura 12). Sugerindo que não há envolvimento de receptores CB1 no efeito do LBI, no modelo avaliado.

Figura 11. Efeito da injeção de cloridrato de rimonabanto (SR141716A) na sensibilidade mecânica dos animais após 1 hora da aplicação do LBI, avaliada por filamentos de von Frey. Os animais foram avaliados antes de qualquer procedimento (Tempo 0), o cloridrato de rimonabanto (SR; 1 mg/kg) foi injetado por via intraperitoneal, 20 min. após a aplicação do LBI. O teste comportamental foi realizado 1 h após a aplicação do LBI. Os dados correspondem à média $\pm$ e.p.m dos grupos. **p=0,0068, STZ NT em comparação com o grupo STZ+L; ***p=0,000, STZ NT em comparação com STZ+L+SR (ANOVA de duas vias, seguido de pós teste de Bonferroni).

Fonte: autor (2018).

Figura 12. Efeito da injeção de cloridrato de rimonabanto (SR141716A) sobre a sensibilidade mecânica dos animais após 21 aplicações de LBI, avaliada por filamentos de von Frey. Os camundongos diabéticos receberam 21 aplicações consecutivas de LBI. O cloridrato de rimonabanto (SR; 1 mg/kg) foi injetado por via intraperitoneal no 21º dia, 20 min. após a última aplicação do LBI. A sensibilidade mecânica foi avaliada por von Frey 1h após a última aplicação do LBI. Quantificado no programa Image J. Os dados correspondem à média $\pm$ e.p.m dos grupos. @@@ $p < 0,0001$, STZ NT em comparação com os grupos STZ+L e STZ+L+SR; @@@@ $p < 0,0001$, STZ NT em comparação com STZ+L e STZ+L+SR (ANOVA de duas vias, seguido de pós teste de Bonferroni).

Fonte: autor (2018).

5.5 Avaliação do efeito do LBI sobre os níveis de NGF

A injeção de STZ diminuiu os níveis de NGF no nervo isquiático dos animais diabéticos quando comparado com os animais tratados com salina (Tabela 2). Ainda, o tratamento com LBI foi capaz de induzir um aumento nos níveis de NGF nos nervos dos animais diabéticos.

Tabela 2. Concentração (pg/ml) de NGF no nervo isquiático de animais diabéticos tratados 21 dias com LBI. Os dados correspondem à média $\pm$ e.p.m. de animais por grupo.

Grupos	Média NGF (pg/ml)
SAL NT (n=4)	0,042 $\pm$ 0,017
SAL+ L (n=7)	0,044 $\pm$ 0,015
STZ NT (n=3)	0,008 $\pm$ 0,001
STZ+L (n=5)	0,016 $\pm$ 0,002

Fonte: autor (2018).

5.6. Tratamento com LBI induz melhora no estado geral dos neurônios de camundongos diabéticos

A análise morfométrica do grupo controle (SAL NT) demonstrou a presença de fibras com mielina íntegra, morfologia arredondada e muito próximos um dos outros (Figura 13A), com a presença de mitocôndrias no seu citoplasma (Figura 13D).

Os animais diabéticos (STZ NT - Figura 13 B-E), no entanto demonstraram degeneração da mielina com a presença de debris citoplasmáticos, além de apresentarem axônios amorfos, dobramento e o desarranjo da compactação da mielina, contribuindo assim para a alteração da sua morfologia, quando comparados ao grupo SAL NT.

Os animais tratados por 21 dias consecutivos com o LBI não demonstraram nenhuma alteração quanto a espessura de mielina quando comparado aos demais grupos (Figura 14). Entretanto, apresentaram uma melhora substancial quanto ao estado dos axônios, ou seja, uma mielina mais conservada (Figura 13 C-F). Adicionalmente, os resultados obtidos até o momento demonstram que o LBI foi capaz de reverter parcialmente à diminuição na quantidade de fibras C nos animais com neuropatia diabética (STZ NT, média: $43,17 \pm 3,78$, $n=3$, $p=0,0239$) (Figura 15).

Figura 13. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) do nervo isquiático de camundongos após 21 dias de tratamento com LBI. (A) SAL NT – visão geral dos axônios mielínicos íntegros, com uma morfologia arredondada (mag. 2.500x). (B) STZ NT - visão geral dos axônios mielínicos amorfos e degradados (seta branca), dobramento da mielina (infolding) (seta preta), grupo de axônios amielínicos (**) (mag. 2.500x). (C) STZ+L - visão geral dos axônios mielínicos expressando uma melhora evidente da bainha de mielina, presença de mitocôndrias (setas pretas) (mag. 2.500x). (D) SAL NT – fibra mielínica íntegra com mitocôndrias no citoplasma (seta preta) (mag. 7.500x). (E) STZ NT – desarranjo da compactação da mielina (**), presença de debris no citoplasma da fibra mielínica (seta branca), separação axoplasma-mielina evidenciada (#) (mag. 7.500x). (F) STZ+L - Melhora dos axônios mielínicos, grupo de axônios amielínicos (**) e presença de mitocôndrias no citoplasma (seta preta)(mag. 7.500x). 10 μ m ou 2 μ m. Análise feita no programa Image J.

Fonte: autor (2018).

Figura 14. Espessura da mielina do nervo isquiático de camundongos após 21 dias de tratamento com LBI. Análise morfológica quantitativa a partir de imagens feitas por microscopia eletrônica de transmissão (2,5K). Os dados correspondem à média $\pm$ e.p.m. dos grupos. Quantificado no programa Image J. (ANOVA de uma via com pós teste de Bonferroni).

Fonte: autor (2018).

Figura 15. Número de fibras C do nervo isquiático de camundongos após 21 dias de tratamento com LBI. Amostras de nervo isquiático foram submetidas à avaliação por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Uma diminuição significativa na contagem de fibras C foi observada em camundongos STZ NT (B/D) quando comparados ao grupo controle SAL NT (A/D). O tratamento com LBI aumentou parcialmente o número de fibras C (C/D). Imagens de ultraestrutura demonstram a quantidade de fibra C em todos os grupos avaliados (→, A-C; 2.5K). Área equivalente a 3235.68 μm^2 . Os dados correspondem à média $\pm$ e.p.m. dos grupos. Quantificado no programa Image J.* $p < 0,05$ STZ NT em comparação com o grupo SAL NT. (ANOVA de uma via com pós teste de Bonferroni).

Fonte: autor (2018).

Para a análise da frequência de separação axoplasma-mielina (Figura 16), foram contabilizados a quantidade de axônios que apresentavam separação axoplasma-mielina, a cada cem axônios contados, sendo o resultado expresso em porcentagem. O grupo STZ NT apresentou um aumento significativo (46,67%, média: $54,00 \pm 14,05$) na separação axoplasma-mielina em comparação ao grupo SAL NT (média: $7,33 \pm 5,46$), em contrapartida, houve redução (42,75%, média: $11,25 \pm 2,53$) na separação axoplasma-mielina do grupo STZ+L em relação ao grupo diabético.

Após a quantificação de mitocôndrias no citoplasma dos axônios por μm^2 (Figura 17), foi possível observar um aumento na quantidade de mitocôndrias citoplasmáticas no grupo tratado (STZ+L, média: $89,90 \pm 7,59$) em relação ao grupo que não recebeu o LBI (STZ NT, média: $60,82 \pm 2,92$).

Figura 16. Frequência da separação axoplasma-mielina do nervo isquiático de camundongos após 21 dias de tratamento com LBI. Amostras de nervo isquiático foram submetidas à avaliação por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). (B/D) Um aumento significativo na separação axoplasma-mielina (seta branca) e a presença de debris citoplasmáticos (seta preta) foram observados em camundongos STZ NT quando comparados ao grupo controle SAL NT (A/D). O tratamento com LBI reverteu completamente este efeito (C/D). Imagens de ultraestrutura demonstram a separação axoplasma-mielina em todos os grupos avaliados ($\rightarrow$, A-C; 2,5K). Área equivalente a 3235.68 μm^2 . Os dados correspondem à média $\pm$ e.p.m. de uma contagem de 100 neurônios por grupo. Quantificado no programa Image J * $p < 0,05$ STZ NT em comparação com o grupo SAL NT, # $p < 0,05$ STZ+L em comparação com o grupo STZ NT. (ANOVA de uma via com pós teste de Bonferroni).

Fonte: autor (2018).

Figura 17. Número de mitocôndria do nervo isquiático de camundongos após 21 dias de tratamento com LBI. Amostras de nervo isquiático foram submetidas à avaliação por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). (B/D) Uma diminuição significativa na contagem de mitocôndrias foi observada em camundongos STZ NT quando comparados ao grupo controle SAL NT (A/D). O tratamento com LBI aumentou significativamente o número de mitocôndrias (C/D). Imagens de ultraestrutura demonstram a quantidade de mitocôndria em todos os grupos avaliados ($\rightarrow$, A-C; 7,5K). Área equivalente a $3235.68 \mu\text{m}^2$. Os dados correspondem à média $\pm$ e.p.m. dos grupos. Quantificado no programa Image J. * $p < 0,05$ STZ NT em comparação com o grupo SAL NT, ## $p < 0,01$ STZ+L em comparação com o grupo STZ NT. (ANOVA de uma via com pós teste de Bonferroni).

Fonte: autor (2018).

5.7 Tratamento com LBI induz alteração na homeostase mitocondrial do nervo isquiático de camundongos diabéticos

O aumento no conteúdo mitocondrial citoplasmático pelo uso do LBI pôde ser confirmado pelo ensaio de Western blotting, usando VDAC2 como um marcador mitocondrial. Os resultados demonstraram que o grupo STZ+L teve uma tendência a aumentar a expressão de VDAC2 em relação à STZ NT, correlacionando-se assim com um possível aumento no número de mitocôndrias (Figura 18A). Em relação à expressão protéica da Parkin, foi encontrada uma diminuição significativa no grupo tratado (SAL NT: $1,042 \pm 0,046$, STZ NT: $0,965 \pm 0,069$ STZ+L: $0,713 \pm 0,040$, $n=5$; $p<0,05$) em relação aos demais grupos (Figura 18B).

Estes resultados sugerem que a laserterapia tem a capacidade de modular o sistema autofágico, mais especificamente, a mitofagia e com isso, pode alterar o conteúdo mitocondrial, levando a uma alteração na homeostase dessa importante organela.

Figura 18. Efeito da laserterapia na expressão de VDAC2 e Parkin no nervo isquiático de camundongos diabéticos após 21 dias de tratamento com LBI. Amostras de nervo isquiático foram removidas após 35 dias de injeção de STZ e 21 aplicações consecutivas de LBI e foram submetidas à expressão da proteína (A) VDAC2 e (B) Parkin avaliadas por western blotting. A β -tubulina foi usada como controle de carga proteica. Os dados correspondem à média $\pm$ e.p.m. da intensidade média de VDAC2 ou Parkin de 5 amostras por grupo. * $p < 0,05$ STZ NT em comparação com o grupo STZ+L, *** $p < 0,001$ SAL NT comparado ao grupo STZ+L. (ANOVA de uma via com pós teste de Bonferroni).

Fonte: autor (2018).

Fonte: autor (2018).

6 DISCUSSÃO

A neuropatia periférica diabética (NPD) é um dos principais problemas associados ao diabetes mellitus, atingindo cerca de 50% dos pacientes portadores da doença e sendo caracterizada pela presença de dor crônica (CHENG, 2010; KHAMSEH, 2011; MANU, 2017). O tratamento da NPD é, até o momento, ineficaz, sendo as terapias atualmente existentes pouco efetivas, beneficiando apenas um pequeno número de pacientes, fazendo-se necessária a descoberta de novas ferramentas para o seu controle. Embora seus mecanismos ainda sejam pouco conhecidos, quando corretamente utilizado, a terapia por fotobioestimulação apresenta efeitos positivos em diversos modelos (ROCHKIND, 2001; SERVETTO, 2017; SONG, 2017).

A avaliação do efeito da terapia por fotobiomodulação em modelo de NPD induzida por estreptozotocina (STZ) em camundongos foi a pergunta inicial feita nesse estudo. O modelo escolhido reproduz de forma confiável o diabetes nos animais e os sinais de neuropatia se desenvolvem rapidamente, uma vez que, uma única dose de STZ, é capaz de induzir ablação quase total de células β pancreáticas, induzindo a diabetes mellitus tipo 1 (CHENG, 2015).

Neste trabalho, a injeção de STZ induziu hiperglicemia crônica nos animais, que se manteve durante todo o período experimental. A neuropatia foi evidenciada pela redução significativa dos limiares nociceptivos mecânicos dos animais após 14 dias da injeção. Esse efeito neuropático da STZ é atribuído apenas à hiperglicemia, uma vez que já se comprovou que a substância, em si, não causa a neuropatia (DAVIDSON, 2010). A perda de peso é decorrente da disfunção metabólica causada pela própria doença, dado que, devido à ausência de insulina no organismo, a glicose não é absorvida pela célula, ocasionando o déficit energético e obrigando o organismo a recorrer a outras fontes, como por exemplo, o aumento do uso metabólico da gordura, gerando a perda de peso não intencional (GUYTON; HALL, 2006). O mesmo ocorreu com os animais no presente estudo, onde foi observada uma perda de peso progressiva nos animais diabéticos, quando comparada aos animais controle (salina).

Dentre os diversos sintomas descritos pelos pacientes com NPD, o desenvolvimento de dor crônica é o mais prevalente, afetando principalmente as extremidades, manifestando-se como respostas de dor a estímulos não dolorosos (alodínia) e respostas exacerbadas para estímulos dolorosos (hiperalgesia) (QUATTRINI; TEFAYE, 2003; TEFAYE, 2005). Tal fenômeno é descrito na literatura como consequência da degeneração de fibras C, levando à mudanças nos ramos de fibras A β (mecanorreceptores cutâneos que propagam a sensação de toque) que se

projetam para a lâmina II da coluna posterior da medula, desenvolvendo conexões patológicas com interneurônios de fibras C degeneradas. Ainda, as novas conexões sinápticas liberam neurotransmissores excitatórios, que normalmente não são encontrados em sinapses relacionadas a esses neurônios (WOOLF, 1995; KAPUR, 2003).

Neste estudo, o tratamento com LBI 660 nm foi capaz de reverter a hipersensibilidade mecânica dos animais 1h após a primeira aplicação, porém, este efeito decaiu nos tempos subsequentes sugerindo que mais aplicações fossem necessárias para a manutenção do efeito antinociceptivo. Assim, aplicações consecutivas por 21 dias do LBI apresentaram efeito antinociceptivo no grupo STZ+L em todos os tempos avaliados. Ainda, em nenhum dos tempos de tratamento, o grupo Sal+L apresentou diferenças estatísticas em relação ao grupo Sal NT, o que indica que o LBI não possui efeito sobre a sensibilidade mecânica normal. Esses dados vão de encontro com a literatura, onde previamente foi mostrado que o comprimento de onda de 660 nm é capaz de estimular a cicatrização de feridas em camundongos diabéticos (PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2012) e também capaz de induzir antinocicepção em roedores submetidos a modelos experimentais de dor neuropática (JANZADEH, 2016; MASOUMIPOOR, 2014; HSIEH, 2012). Além disso, o efeito antinociceptivo foi específico para a reversão da dor, visto que não se observou alterações de peso e glicemia dos animais tratados ao longo do período experimental, semelhante ao observado em outros estudos (KOBIELA KETZ, 2016; ROCHA, 2017).

Para se investigar os mecanismos envolvidos no efeito do LBI, avaliamos os receptores opióides por meio do tratamento farmacológico com naloxona (NLX). Nossos resultados demonstraram que os receptores opióides estão envolvidos no efeito agudo, mas não crônico do LBI, uma vez que a naloxona foi capaz de reverter a nocicepção induzida pelo LBI apenas na primeira hora de irradiação. Ainda, nossos resultados demonstram que o efeito antinociceptivo depende da liberação central de opióides, uma vez que o tratamento com metiodato de naloxona, que não atravessa a barreira hematoencefálica (LEWANOWITSCH; IRVINE, 2003), não foi capaz de reverter a analgesia observada. Esses dados corroboram com dados da literatura que demonstram que a analgesia decorrente do tratamento com o LBI está relacionada com um aumento central na atividade de opióides endógenos (HAGIWARA, 2007; HAGIWARA, 2008; HONMURA, 1993).

Uma vez que não se observou envolvimento de receptores opióides no efeito tardio do LBI, avaliamos os receptores canabinóides na analgesia observada. Sabe-se que o sistema endocanabinóide está envolvido na regulação da via inibitória descendente de dor em diferentes níveis da via nociceptiva, agindo de maneira distinta, mas paralela àquela que envolve opióides (IVERSEN; CHAPMAN, 2002). Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento com SR141716A, um agonista inverso de receptores canabinóides do tipo 1 (DIMOV, 2017) também não foi capaz de interferir com a analgesia observada. Em conjunto, esses dados sugerem que o tratamento prolongado com LBI possa estar induzindo alterações neuroplásticas permanentes que mantêm o estado antinociceptivo, sem, no entanto, depender da liberação periférica de opióides e/ou canabinóides.

Ainda, além de reverter o quadro nociceptivo, demonstramos, que o tratamento com LBI é capaz de induzir um processo de regeneração nervosa, demonstrado pelo aumento dos níveis de NGF no nervo isquiático dos animais diabéticos, considerando o papel protetor dessa neurotrofina (PITTENGER; VINIK, 2003), esse aumento é essencial para a regeneração e sobrevivência das fibras periféricas, contribuindo para o resultado observado, sustentando o efeito terapêutico do LBI na neuropatia diabética.

O tratamento com LBI também reverteu a degeneração nervosa observada nos nervos isquiáticos dos animais, principalmente no que se refere à degeneração da mielina. Os animais diabéticos apresentaram aumento na separação de axoplasma-mielina e diminuição da contagem de fibras C avaliadas por MET, característicos do modelo aqui escolhido. Essas alterações foram significativamente revertidas pelo tratamento com LBI. Mais interessante é que além de induzir uma melhora no estado geral da mielina dos animais, demonstramos pela primeira vez não só o aumento direto no número total de mitocôndrias nos nervos isquiáticos dos animais tratados com laser, mas também que esta ferramenta foi capaz de induzir mudanças metabólicas nessas organelas diminuindo sua morte. Estes resultados sugerem que o LBI tem a capacidade de modular o sistema autofágico, mais especificamente, a mitofagia e, com isso, pode alterar o conteúdo mitocondrial, levando a uma alteração na homeostase dessa importante organela, diminuindo os processos de autofagia e consequentemente diminuindo o estresse oxidativo gerando um efeito protetor ou reparador direto nos animais tratados.

Em conjunto, os dados aqui obtidos demonstram que a terapia por laser de baixa intensidade é capaz de induzir mecanismos analgésicos e regenerativos em modelo experimental

de neuropatia diabética induzida por estreptozotocina em camundongos. Esses dados têm aplicação direta na clínica médica e reforçam que esta ferramenta deva ser melhor estudada para que pacientes com neuropatia diabética possam receber benefícios importantes a curto prazo. Os mecanismos exatos pelos quais o LBI induz analgesia e regeneração nervosa ainda precisam ser elucidados e fazem parte dos objetivos do nosso laboratório.

7 CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo demonstram que o tratamento com LBI induz antinocicepção, parcialmente mediada por opióides endógenos em camundongos submetidos a um modelo de neuropatia periférica diabética. Ainda, o LBI restaura a morfologia axonal e a funcionalidade mitocondrial e induz aumento de NGF, no nervo isquiático dos animais. Estes dados reforçam o potencial terapêutico do LBI no tratamento da NPD.

8 REFERÊNCIAS*

- AKIL, H., WATSON, S. J., YOUNG, E., LEWIS, M. E., KHACHATURIAN, H., WALKER, J. M. Endogenous opioids: biology and function. **Annual review of neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 223-255, 1984.
- ALBERTI, K.G.M.M., ZIMMET, P.Z. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Provisional Report of WHO Consultation. **Diabetic Medicine**, 15: 539–553, 1998.
- ALBREKTSSON, T; HANSSON, H.A. An ultrastructural characterization of the interface between bone and sputtered titanium or stainless steel surfaces. **Biomaterials**. v. 7, n. 3: 201-205, 1986.
- ALCANTARA, C. C., GIGO-BENATO, D., SALVINI, T. F., OLIVEIRA, A. L., ANDERS, J. J., RUSSO, T. L. Effect of Low-Level Laser Therapy (LLLT) on Acute Neural Recovery and Inflammation-Related Gene Expression After Crush Injury in Rat Sciatic Nerve. **Lasers in surgery and medicine**, v. 45, n. 4: 246-252, 2013.
- ALEY, K. O.; LEVINE, J. D. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. *Neuroscience*, v. 111, n. 2, p. 389-397, 2002
- ALMEIDA, R.D., MANADAS, B.J., MELO, C.V., GOMES, J.R., MENDES, C.S., GRAOS, M.M., ... & DUARTE, C.B. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. **Cell Death Differ.** 12, 1329–1343, 2005.
- AMORIM, J. C.; DE SOUZA G.R.; DE BARROS SILVEIRA L; PRATES, R. A.; PINOTTI, M.; RIBEIRO, M. S. Clinical study of the gingival healing after gingivectomy and lowlevel laser therapy. **Photomed laser surg.**, 24, n. 5: 588-94, 2006.
- ANDREASSEN, C.S., JAKOBSEN, J., FLYVBJERG, A., ANDERSEN, H. Expression of neurotrophic factors in diabetic muscle—relation to neuropathy and muscle strength. **Brain**, 132; 2724–2733 | 2724, 2009.
- ATTAL, N. Chronic neuropathic pain: mechanisms and treatment. **The Clinical journal of pain**, v. 16, n. 3, p. S118-S130, 2000.
- BARRET, A. M.; LUCERO, M. A., LE, T.; ROBINSON, R. L.; DWORKIN, R. H.; CHAPPELL, A. S. Epidemiology, public health burden, and treatment of diabetic peripheral neuropathic pain: a review. **Pain medicine**, v. 8, n. s2, p. S50-S62, 2007.
- BAXTER, G. D. Therapeutic laser: Theory and practice. **Churchill Livingstone**, p. 1-19, 1997.
- BESSON, J. M. The neurobiology of pain. *Lancet*, v. 353, p. 1610-1615, 1999
- BOIVIE, J., LEIJON, G., JOHANSSON, I. Central post-stroke pain—a study of the mechanisms through analyses of the sensory abnormalities. **Pain**, v. 37, n. 2, p. 173-185, 1989.

BOULTON, A. J.M., VINIK, A.I., AREZZO, J. C., BRIL, V., FELDMAN, E. L., FREEMAN, R., ... & ZIEGLER, D. Diabetic Neuropathies. A statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 28, p. 956-962, 2005.

BRUGNERA JR, A.; PINHEIRO, A. L. B. Lasers na odontologia moderna. São Paulo: **Pancast**, p. 356, 1998.

CALVO, M., DAWES, J. M., BENNETT, D. L. The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. **Lancet Neurol**, v.11:629–42, 2012.

CALVO, M., BENNETT, D.L. The mechanisms of microgliosis and pain following peripheral nerve injury. **Exp Neurol**; 234:271–82, 2012.

CAMERON, N. E., COTTER, M. A. Metabolic and vascular factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Diabetes**, v. 46, n. Supplement 2, p. S31-S37, 1997.

CAMPANA, V.; MOYA, M.; GAVOTTO, A.; JURI, H.; PALMA, J. A. Effects of diclofenac sodium and He: Ne laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels in inflammatory processes. **Journal of clinical laser medicine & surgery**, v. 16, n. 6, p. 317-320, 1998.

CAMPBELL, J. N, MEYER, R. A. Mechanisms of neuropathic pain. **Neuron**, v. 52, n. 1, p. 77-92, 2006.

CAO, X. H.; BYUN, H. S.; CHEN, S. R.; CAI, Y. Q.; PAN, H. L. Reduction in voltage-gated K⁺ channel activity in primary sensory neurons in painful diabetic neuropathy: role of brain-derived neurotrophic factor. **Journal of Neurochemistry**, v. 114, n. 5, p. 1460-1475, 2010.

CHAPLAN, S.R., BACH F.W., POGREL, J.W., CHUNG, J.M., AND YAKSH, T.L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of neuroscience methods**, v. 53, n. 1, p. 55-63, 1994.

CHENG, H. T, DAUCH, J. R, OH S. S., HAYES, J. M., HONG, Y., FELDMAN, E. L. p38 mediates mechanical allodynia in a mouse model of type 2 diabetes. **Molecular Pain**, v. 6, n. 28, p. 1-14, 2010.

CHENG, Y., KANG, H., SHEN, J., HAO, H., LIU, J., GUO, Y., MU, Y., HAN, W. Beta-cell regeneration from vimentin+/MafB+ cells after STZ induced extreme beta-cell ablation. **Sci Rep.**, 5:11703, 2015.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual review of neuroscience**, v. 32, p. 1, 2009.

COPPEY, L.; DAVIDSON, E.; LU, B.; GERARD, C.; YOREK, M. Vasoepitidase inhibitor ilepatril (AVE7688) prevents obesity-and diabetes-induced neuropathy in C57Bl/6J mice. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 2, p. 259-266, 2011.

CRUCCU, G., ANAND, P., ATTAL, N., GARCIA-LARREA, L., HAANPÄÄ, M., JORUM, E., SERRA, J. & JENSEN, T. S. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment. **European Journal of Neurology**, v. 11, n. 3, p. 153-162, 2004.

DAVIDSON, E.; COPPEY, L.; LU, B.; ARBALLO, V.; CALCUTT, N. A.; GERARD, C.; YOREK, M. The roles of streptozotocin neurotoxicity and neutral endopeptidase in murine experimental diabetic neuropathy. **Experimental diabetes research**, v. 2009, 2010.

DAWBARN, D., ALLEN, S.J. Neurotrophins and neurodegeneration. **Neuropathol Appl Neurobiol**, 29: 211–30, 2003.

DE OLIVEIRA MARTINS, D., MARTINEZ DOS SANTOS, F., EVANY DE OLIVEIRA, M., ... & J. CHACUR, M. Laser Therapy and Pain-Related Behavior after Injury of the Inferior Alveolar Nerve: Possible Involvement of Neurotrophins. **Journal of Neurotrauma**, 30:480–486, 2013.

DEVOR, M.; WALL, P. D. Cross-excitation in dorsal root ganglia of nerve-injured and intact rats. **J Neurophysiol**, v.64(6):1733-46, 1990.

DEVOR, M.; WALL, P. D.; MELZACK, R. The pathophysiology of damaged peripheral nerves. In **Textbook of pain**, Wall P, Melzack R (eds). Churchill Livingstone: New York, 79–100, 1994.

DIAS, V. Diagnóstico identifica dor neuropática com mais precisão. 2015 <<http://www.usp.br/agen/?p=212710>>. Acesso em: 03 de abril de 2018.

DICKENSON A.H. Neurophysiology of opioid poorly responsive pain. **Cancer surveys**, v. 21, p. 5-16, 1994.

DIMOV, L.F., TONIOLO, E.F., ALONSO-MATIELO, H., DE ANDRADE, D.C., GARCIA-LARREA, L.,... & DALE, C, S. Electrical stimulation of the insular cortex as a novel target for the relief of refractory pain: An experimental approach in rodents. **Behav Brain Res**. 2;346:86-95, 2017.

DMC Importação E Exportação De Equipamentos LTDA. <<http://www.dmcgroup.com.br/es/detalhe-produto/odontologica/equipos/laserterapia/photon-lase-iii/243>>. Acesso em: 03 de abril de 2018.

DYCK, P.J.; GIANNINI, C. Pathologic alterations in the diabetic neuropathies of humans: a review. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 55, n. 12, p. 1181-1193, 1996.

DWORKIN, R. H., BACKONJA, M., ROWBOTHAN, M. C., ALLEN, R. R., ARGOFF, C. R., BENNETT, G. J., ... & WEINSTEIN, S. M. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Archives of neurology**, v. 60, n. 11, p. 1524-1534, 2003.

EMPL, M., RENAUD, S., ERNE, B., FUHR, P., STRAUBE, A., SCHAEREN-WIEMERS, N., STECK, A. J. TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies. **Neurology**, v. 56, n. 10, p. 1371-1377, 2001.

ERICHSEN, H. K.; BLACKBURN-MUNRO, G. Pharmacological characterisation of the spared nerve injury model of neuropathic pain. **Pain**, v. 98, n. 1, p. 151-161, 2002.

ERNSBERGER U. Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. **Cell Tissue Res**; 336(3):349–84, 2009.

FELDMAN, E. L., STEVENS, M. J., RUSSELL, J. W; PELTIER, A., INZUCCHI, S., PORTE, J. D., SHERWIN, R.S., BARON, A. The Diabetes Mellitus Manual. **McGraw-Hill**, Somatosensory neuropathy, v. 6, p. 366-384, 2005.

FIELDS, H.L., HEINRICHER, M.M., MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annu Rev Neurosci**, v.14:219-45. 1991.

GÁL, P.; MOKRÝ, M.; VIDINSKÝ, B.; KIÍK, R.; DEPTA F.; HARAKALOVÁ, M.; LONGAUER, F.; MOZES, S.; SABO, J. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and corticosteroid-treated rats. **Lasers in medical science**, v. 24, n. 4, p. 539-547, 2009.

GALER, B. S. Neuropathic pain of peripheral origin: Advances in pharmacologic treatment. **Neurology**, v. 45, n. 12 Suppl 9, p. S17-S25, 1995.

GENG, S.J., LIAO, F.F., DANG, W.H., DING, X., LIU, X.D., CAI, J., HAN, J.S., WAN, Y., XING, G.G. Contribution of the spinal cord BDNF to the development of neuropathic pain by activation of the NR2B-containing NMDA receptors in rats with spinal nerve ligation. **Exp. Neurol.** 222, 256–266, 2010.

GENOVESE, W. J. Laser de baixa potência: aplicações terapêuticas em odontologia. São Paulo: **Lovisa**, 2000.

GOMES, L. E. A., DALMARCO, E. M., & ANDRÉ, E. S. The brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, neurotrophin-3, and induced nitric oxide synthase expressions after low-level laser therapy in an axonotmesis experimental model. **Photomedicine and laser surgery**, v. 30, n. 11, p. 642-647, 2012.

GONZÁLEZ-CLEMENTE, J. M.; MAURICIO, D.; RICHART, C.; BROCH, M.; CAIXAS, A.; MEGIA, A.; ... & VENDRELL, J. Diabetic neuropathy is associated with activation of the TNF- α system in subjects with type 1 diabetes mellitus. **Clinical endocrinology**, v. 63, n. 5, p. 525-529, 2005.

GOZZANI, J. L. Fisiopatologia da dor. In: Cavalcanti, I. L. Madalena, M. L. **Dor**. Rio de Janeiro: Sociedade de Anestesiologia do estado do Rio de Janeiro, p. 13-51, 2003.

GRACEY, R. H., LYNCH, S. A., BENNETT, G. J. Painful neuropathy: altered central processing maintained dynamically by peripheral input. **Pain**, v. 51, n. 2, p. 175-194, 1992.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 10ª ed. Rio de Janeiro, **Elsevier** Ed., pg. 827-840, 2006.

HAGIWARA, S., IWASAKA, H., OKUDA, K., NOGUCHI, T. GaAlAs (830 nm) low-level laser enhances peripheral endogenous opioid analgesia in rats. **Lasers in surgery and medicine**, v. 39, n. 10, p. 797-802, 2007.

HAGIWARA, S., IWASAKA, H., HASEGAWA, A., NOGUCHI, T. Pre-irradiation of blood by gallium aluminum arsenide (830 nm) low-level laser enhances peripheral endogenous opioid analgesia in rats. **Anesthesia & Analgesia**, v. 107, n. 3, p. 1058-1063, 2008.

HASHMI, J. T., HUANG, Y-Y., OSMANI, B. Z., SHARMA, S. k., NAESER, M. A., HAMBLIN, M. R. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. **PM R.** 2:S292–S305, 2010.

HONG, S.; MORROW, T. J.; PAULSON, P. E.; ISOM, L. L.; WILEY, J. W. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 28, p. 29341-29350, 2004.

HONMURA, A., ISHII, A., YANASE, M., OBATA, J., & HARUKI, E. **Lasers in surgery and medicine**, v. 13, n. 4, p. 463-469, 1993.

HSIEH, Y. L.; CHOU, L. W.; CHANG, P. L.; YANG, C. C.; KAO, M. J.; HONG, C. Z.. Low-level laser therapy alleviates neuropathic pain and promotes function recovery in rats with chronic constriction injury: Possible involvements in hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α). **Journal of Comparative Neurology**, v. 520, n. 13, p. 2903-2916, 2012.

IASP (International Association for the Study of Pain). **IASP Taxonomy – Introduction to the 1994 list.** (1994). Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/Taxonomy>> Acesso em: 11.julho.2017.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF- Diabetes Atlas**, 8th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017.

IVERSEN, L. & CHAPMAN, V. Cannabinoids: a real prospect for pain relief?. **Curr Opin Pharmacol.**; 2(1):50-5, 2002.

JABBUR, S. J.; SAADÉ, N. E. From aletrical wiring to plastic neurons: envolving approaches to the study of pain. **Pain**, v. 87, p. 87-92, 1999.

JAGODIC, M. M.; PATHIRATHNA, S.; NELSON, M. T.; MANCUSO, S.; JOKSOVIC, P. M.; ROSENBERG, E. R.; ... & TODOROVIC, S. M. Cell-specific alterations of T-type calcium current in painful diabetic neuropathy enhance excitability of sensory neurons. **The Journal of neuroscience**, v. 27, n. 12, p. 3305-3316, 2007.

JANZADEH, A., NASIRINEZHAD, F., MASOUMIPOOR, M., JAMEIE, S.B., HAYAT, P. Photobiomodulation therapy reduces apoptotic factors and increases glutathione levels in a neuropathic pain model. **Lasers Med Sci**, 31(9):1863-1869, 2016.

JOHNSON, P.C.; DOLL, S.C.; CROMEY, D.W., DOUGLAS, W. Pathogenesis of diabetic neuropathy. **Annals of neurology**, v. 19, n. 5, p. 450-457, 1986.

JOHNSON, M. S.; RYALS, J. M.; WRIGHT, D. E. Diabetes-induced chemogenic hypoalgesia is paralleled by attenuated stimulus-induced fos expression in the spinal cord of diabetic mice. **The Journal of Pain**, v. 8, n. 8, p. 637-649, 2007.

KAPUR, D. Neuropathic pain and diabetes. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 19, n. S1, p. S9-S15, 2003.

KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health physics**, v. 56, n. 5, p. 691-704, 1989.

KHAMSEH, M. E.; KAZEMIKHO, N.; AGHILI, R.; FOROUGH, B.; LAJEVARDI, M.; HASHEM DABAGHIAN, F.; GOUSHEGIR, A.; MALEK, M. Diabetic distal symmetric polyneuropathy: effect of low-intensity laser therapy. **Lasers in medical science**, v. 26, n. 6, p. 831-835, 2011.

KITCHEN, S. S.; PARTRIDGE, C. J. A Review of low-level therapy parts I: Background, Physiological effects and hazards. **Physiotherapy**, v. 77, n. 3, p. 161–163, 1991.

KLEBANOV, G.I.; KREININA, M.V.; POLTANOV, E.A.; KHRISTOFOROVA, T.V.; VLADMIROV, Y.A. Mechanism of therapeutic effect of low-intensity infrared laser radiation. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 131, n. 3, p. 239-241, 2001.

KOBIELA KETZ, A., BYRNES, K.R., GRUNBERG, N.E., KASPER, C.E., OSBORNE, L., PRYOR, B., TOSINI, N.L., WU, X., ANDERS, J.J. Characterization of Macrophage/Microglial Activation and Effect of Photobiomodulation in the Spared Nerve Injury Model of Neuropathic Pain. **Pain Med.**18(5):932-946, 2016.

KUBLI, D. A., GUSTAFSSON, Å. B. Unbreak my heart: targeting mitochondrial autophagy in diabetic cardiomyopathy. **Antioxid Redox Signal.** 22(17):1527-44, 2015.

LENNERTZ, R.C., MEDLER, K.A., BAIN, J.L., WRIGHT, D.E., STUCKY, C.L. Impaired sensory nerve function and axon morphology in mice with diabetic neuropathy. **J Neurophysiol.**, 106(2):905, 2011.

LI, W., DU, M., WANG, Q., MA, X., WU, L., GUO, F., JI, H., HUANG, F., QIN, G. FoxO1 Promotes Mitophagy in the Podocytes of Diabetic Male Mice via the PINK1/Parkin Pathway. **Endocrine Society.**158(7):2155-2167, 2017.

MALCANGIO, M., LESSMANN, V. A common thread for pain and memory synapses? Brain-derived neurotrophic factor and trkB receptors. **Trends Pharmacol. Sci.** 24, 116–121, 2003.

MANU, M. S., RACHANA, K. S., ADVIRAO, G.M. Altered expression of IRS2 and GRB2 in demyelination of peripheral neurons: Implications in diabetic neuropathy. **Neuropeptides**, 62:71-79, 2017.

MASOUMIPOOR, M., JAMEIE, S.B., 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.**, 29(5):1593-8, 2014.

MEACHAM, K., SHEPHERD, A., MOHAPATRA, D.P., HAROUTOUNIAN, S. Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. **Curr Pain Headache Rep.**, 21(6):28, 2017.

MELLO, J. B., MELLO, G. P. S. Laser em odontologia. 1ªed. São Paulo, **Ed. Santo**, 174p., 2001.

MESTER, A. Laser Biostimulation. **Photomedicine and laser surgery**, v. 31, n. 6, p. 237-239, 2013.

MIRZAEI, M., BAYAT, M., MOSAFA, N., MOHSENIFAR, Z., PIRYAEI, A., FAROKHI, B., REZAEI, F., SADEGHI, Y., RAKHSHAN, M. Effect of low-level laser therapy on skin

fibroblasts of streptozotocin-diabetic rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 6, p. 519-25, 2007.

ORTIZ, M. C. S.; MATIELLO-ROSA, S. M.; SOARES, E. G.; PARIZOTTO, N. A. Influência do laser de baixa potência nos níveis das proteínas plasmáticas de coelhos. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 7, n. 3, p. 187-194, 2003.

PASSARELLA, S.; CASAMASSIMA, E.; MOLINARI, S.; PASTORI, D.; QUAGLIARIELLO, E.; CATALANO, I. M.; CINGOLANI, A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **FEBS letters**, v. 175, n. 1, p. 95-99, 1984.

PAYNE, R. Neuropathic pain syndromes, with special reference to causalgia and reflex sympathetic dystrophy. **The Clinical journal of pain**, v. 2, n. 1, p. 59-73, 1986.

PEPLOW, P.V., CHUNG, T.Y., BAXTER, G.D. Laser photostimulation (660 nm) of wound healing in diabetic mice is not brought about by ameliorating diabetes. **Lasers Surg Med**; 44(1):26-9, 2012.

PETROU, M, POP-BUSUI, R., FOERSTER, B.R., EDDEN, R.A., CALLAGHAN, B.C., HARTE, S.E., HARRIS, R.E., CLAUW, D.J., FELDMAN, E.L. Altered excitation-inhibition balance in the brain of patients with diabetic neuropathy. **Acad Radiol.**; 19(5):607-12, 2012.

PITTENGER, G., VINIK, A. Nerve growth factor and diabetic neuropathy. **Experimental Diabetes Research**, v. 4, n. 4, p. 271-285, 2003.

PITTS, E.V., POTLURI, S., HESS, D.M., BALICE-GORDON, R.J. Neurotrophin and Trk-mediated signaling in the neuromuscular system. **Int Anesthesiol Clin.**, 44: 21–76, 2006.

PLEUVRY, B. J.; LAURETTI G. R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacology & therapeutics**, v. 71, n. 3, p. 313-324, 1996.

QUATTRINI, C., TESFAYE, S. Understanding the impact of painful diabetic neuropathy. **Diabetes Metab Res Rev**; 19: S2–S8, 2003.

RAGHOEBAR, G. M., MEINJERT, L., KALK, W.W., VISSINK, A. Morbidity of mandibular bone harvesting: a comparative study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, 22, 359–365, 2007.

ROCHA, I.R., CIENA, A.P., ROSA, A.S., MARTINS, D.O., CHACUR M. Photobiostimulation reverses allodynia and peripheral nerve damage in streptozotocin-induced type 1 diabetes. **Lasers Med Sci**, 32(3):495-501, 2016.

ROCHKIND, S.; NISSAN, M.; ALON, M.; SHAMIR, M.; SALAME, K. Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats. **Lasers in surgery and medicine**, v. 28, n. 3, p. 216-219, 2001.

ROCHKIND, S.; DRORY, V.; ALON, M.; NISSAN, M.; OUAKNINE, G. E. Laser phototherapy (780 nm), a new modality in treatment of long-term incomplete peripheral nerve injury: a randomized double-blind placebo-controlled study. **Photomedicine and laser surgery**, v. 25, n. 5, p. 436-442, 2007.

RONDÓN, L. J.; PRIVAT, A. M.; DAULHAC, L.; DAVIN, N.; MAZUR, A.; FIALIP, J., ESCHALIER, A., COURTEIX, C. Magnesium attenuates chronic hypersensitivity and spinal cord NMDA receptor phosphorylation in a rat model of diabetic neuropathic pain. **The Journal of physiology**, v. 588, n. 21, p. 4205-4215, 2010.

SAGARA, M.; SATOH, J.; WADA, R.; YAGIHASHI, S.; TAKAHASHI, K...; FUKUZAWA, M.; ... & TOYOTA, T. Inhibition of development of peripheral neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats with N-acetylcysteine. **Diabetologia**, v. 39, n. 3, p. 263-269, 1996.

SAH, D. W., OSSIPO, M. H., PORRECA, F. Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 6, p. 460-472, 2003.

SAID, G. Diabetic neuropathy—a review. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 3, n. 6, p. 331-340, 2007.

SERVETTO, N., CREMONEZZI, D., SIMES, J.C., DI PIETRO, A., CAMPANA, V.R. Histomorphologic and ultrastructural recovery of myopathy in rats treated with low-level laser therapy. **Lasers Med Sci**, 32(4):841-849, 2017.

SHAMIR, M. H.; ROCHKIND, S.; SANDBANK, J.; ALON, M. Double-blind randomized study evaluating regeneration of the rat transected sciatic nerve after suturing and postoperative low-power laser treatment. **Journal of reconstructive microsurgery**, v. 17, n. 02, p. 133-138, 2001

SIFUENTES-FRANCO, S., PACHECO-MOISÉS, F. P., RODRÍGUEZ-CARRIZALEZ, A.D., MIRANDA-DÍAZ, A.G. The Role of Oxidative Stress, Mitochondrial Function, and Autophagy in Diabetic Polyneuropathy. **J Diabetes Res**. 2017:1673081, 2017.

SKUNDRIC, D.S.; LISAK, R.P. Role of neuropoietic cytokines in development and progression of diabetic polyneuropathy: from glucose metabolism to neurodegeneration. **Journal of Diabetes Research**, v. 4, n. 4, p. 303-312, 2003.

STEIN, C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 25, p. 1685-1690, 1995.

SONG, J.W., LI, K., LIANG, Z.W., DAI, C., SHEN, X.F., GONG, Y.Z., WANG, S., HU, X.Y., WANG, Z. Low-level laser facilitates alternatively activated macrophage/microglia polarization and promotes functional recovery after crush spinal cord injury in rats. **Sci Rep.**, 4;7(1):620, 2017.

TESFAYE, S.; KEMPLER, P. Painful diabetic neuropathy. **Diabetologia**, v. 48, n. 5, p. 805-807, 2005.

THOMAS, P. K.; TOMLINSON, D. R. Diabetic and hypoglycemic neuropathy. In: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF, eds. **Peripheral Neuropathy**. 3rd ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co:1219-1250, 1993.

TOMLINSON, D.R.; GARDINER, N.J. Glucose neurotoxicity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 36-45, 2008.

TOTH, C. C, JEDRZEJEWSKI, N.M., ELLIS, C.L., FREY, W.H. Cannabinoid-mediated modulation of neuropathic pain and microglial accumulation in a model of murine type I diabetic peripheral neuropathic pain. **Molecular Pain**, v. 6, n. 1, p. 16, 2010.

TUNNER, J.; HODE, L. Low level laser therapy: Clinical practice and scientific background. **Sweden: Prima Books**, 2002.

VINCENT, A.M.; CALLAGHAN, B.C.; SMITH, A.L., FELDMAN, E.L. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. **Nature Reviews Neurology**, v. 7, n. 10, p. 573-583, 2011.

VINIK, A. I. Diabetic Neuropathy: Pathogenesis and Therapy. **Am J Med.**, v. 107(2B):17S–26, 1999.

WALSH, L. J. The current status of low-level laser therapy in dentistry, Part 1. **Soft tissue applications**. Australian dental journal, v. 42, n. 4, p. 247-254, 1997.

WANG, L., SUN, M., JIANG, Y., YANG, L., LEI, D., LU, C., ZHAO, Y., ZHANG, P., YANG, Y., LI, J. Nerve growth factor and tyrosine kinase A in human salivary adenoid cystic carcinoma: expression patterns and effects on in vitro invasive behavior. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, 64, 636–641, 2006.

WILLIAMS, A.C.C.; CRAIG, K. D. Updating the definition of pain. **Pain**, v. 157, p 2420–2423, 2016.

WOOLF, C.J., SHORTLAND, P., REYNOLDS, M., RIDINGS, J., DOUBELL, T., COGGESHALL, R.E. Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. **J Comp Neurol**; 360(1): 121–134, 1995.

WOOLF, C.J.; MA, Q. Nociceptors-noxious stimulus detectors. **Neuron**, v. 55, n.3, p.353-364, 2007.

YAMAKAWA, I., KOJIMA, H., TERASHIMA, T., KATAGI, M., OI, J., URABE, H., ... & KIMURA, H. Inactivation of TNF- α ameliorates diabetic neuropathy in mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 301, n. 5, p. E844-E852, 2011.

YAZDANI, S. O., GOLESTANEH, A. F., SHAFIEE, A., HAFIZI, M., OMRANI, H. A. G., SOLEIMANI, M. Effects of low level laser therapy on proliferation and neurotrophic factor gene expression of human schwann cells in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 107, p. 9-13, 2012.

ZHAO, H., ALAM, A., CHEN, Q., EUSMAN, M.A., PAL, A., EGUCHI, S., WU, L., MA, D. The role of microglia in the pathobiology of neuropathic pain development: what do we know? **British Journal of Anaesthesia**, 118 (4): 504–16, 2017.

ZIMMERNANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **European journal of pharmacology**, v. 429, n. 1, p. 23-37, 2001.

*De acordo com a ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14724: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2011

FULL ARTICLE

Photobiomodulation induces antinociception, recovers structural aspects and regulates mitochondrial homeostasis in peripheral nerve of diabetic mice

Victória R. da Silva Oliveira¹ | Diego P. Cury² | Laura B. Yamashita¹ | Marcos V. Esteca³ |

Ii-Sei Watanabe² | Yoko Fee Bergmann¹ | Elaine F. Toniolo^{1,4} | Camila S. Dale^{1*}

¹Laboratory of Neuromodulation of Experimental Pain, Department of Anatomy, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

²Laboratory of Ultrastructure of Cells and Tissues, Department of Anatomy, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³Laboratory of Cellular and Tissue Biology, Faculty of Applied Sciences, University of Campinas, Limeira, Brazil

⁴Univeristy City of São Paulo, Medical School, São Paulo, Brazil

*Correspondence

Camila Squarzon Dale, Laboratory of Neuromodulation of Experimental Pain, Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 2415, ICB-III, Cidade Universitária, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil.

Email: camila.dale@usp.br

Funding information

FAPESP, Grant/Award Numbers: 2014/03270-1, 2015/17136-8, 2016/10372-0

Diabetic peripheral neuropathy (DPN) is a nervous disorder caused by diabetes mellitus, affecting about 50% of patients in clinical medicine. Chronic pain is one of the major and most unpleasant symptoms developed by those patients, and conventional available treatments for the neuropathy, including the associated pain, are still unsatisfactory and benefit only a small number of patients. Photobiomodulation (PBM) has been gaining clinical acceptance once it is able to promote early nerve regeneration resulting in significant improvement in peripheral nerves disabilities. In this work, the effects of PBM (660 nm, 30 mW, 1.6 J/cm², 0.28 cm², 15 s in a continuous frequency) on treating DPN-induced pain and nerve damage were evaluated in an experimental model of diabetic-neuropathy induced by streptozotocin in mice. PBM-induced antinociception in neuropathic-pain mice was dependent on central opioids release. After 21 consecutive applications, PBM increased nerve growth factor levels and induced structural recovery increasing mitochondrial content and regulating Parkin in the sciatic nerve of DPN-mice. Taking together, these data provide new insights into the mechanisms involved in the effects of PBM-therapy emphasizing its therapeutic potential in the treatment of DPN.

KEYWORDS

diabetic neuropathy, mitochondrial homeostasis, pain, photobiomodulation

1 | INTRODUCTION

Diabetes mellitus is a multifactorial disease characterized by chronic hyperglycemia and dysfunctions in the metabolism. The deficiency in secretion or action of insulin can damage several organs in long term. In extreme cases, in the absence of treatments, ketoacidosis and blood hyperosmolarity can result in coma and death [1].

Peripheral neuropathy is the most common long-term complication in diabetes, being extremely disabling for patients [2]. It is estimated that of the 425 million people affected by diabetes, around 60% to 70% are affected by some form of neuropathy or will develop it at some point in

their life [3]. Diabetic peripheral neuropathy (DPN) is a more frequent manifestation, occurring in about 50% of the diabetic patients [4]. Among the symptoms reported by compromised individuals, it also described the appearance of tingling, limb sensitivity loss, weakness and numbness [5], but among them stands out the development of chronic pain, which mainly affects the extremities, manifesting in the form of allodynia and hyperalgesia.

It is known that inadequate glycemic controls, and the duration of diabetes, are directly factors correlated with the development of DPN [6]. However, the mechanisms behind pain emergence remain unclear [4, 7]. Although nerve degeneration (demyelination, and loss of myelinated and

unmyelinated fibers), hyperactivity of neurons, deficits of neurotrophic factors, and ischemia due to vascular disorders have been identified as responsible for the development and maintenance of DPN and, the therapies available so far, are complex and ineffective, conferring pain relief only for a small portion of patients.

Although there is no specific treatment for DPN, the great majority of pharmacological treatments for neuropathic pain are aimed at blocking neurotransmission, as is the case with tricyclic antidepressants and anticonvulsants, but in general, their effectiveness is limited, since several inflammatory mediators are present, sensitizing and activating the neurons of nociceptive route. Beyond them, there are still systemic administration of local anesthetics, application of topical agents, and administration of narcotic and nonnarcotic analgesics [8–10]. However, they are ineffective and many side effects cannot be avoided.

In this way, new therapeutic approaches have been raised as potential forms of treatment for several nerve lesions. In order to promote a better nerve regeneration, the literature highlights the use of photobiomodulation (PBM) therapy. PBM which uses red or near infrared laser irradiation is known for its biomodulatory, analgesic and anti-inflammatory actions on various tissues. Although PBM has positive results in lesions in various tissues, the mechanisms by which light energy is converted into biochemical effects, generating analgesia and regenerating tissues still require further clarification.

The literature attributes the biological effects of PBM to the action of photons on certain cellular organelles, such as mitochondria, triggering an increase in the speed and efficiency of ATP synthesis and modifications in ionic transport [11]. Some other reported effects are inflammatory processes control, promotion of tissue regeneration, reduction of painful symptomatology, restoration of post-injury neural function, acceleration of bone remodeling and repair, stimulation of endorphin release, modulation of the immune system and modulation of nerve growth factor (NGF) and brain-derived nerve factor levels [12–17].

Regarding DPN, it has been shown that PBM is able to improve the velocity of nerve conduction of diabetic patients with distal polyneuropathy [18]. Also it was experimentally demonstrated that PBM induces analgesia in rats mediated by the increased production of endogenous opioids [19], reinforcing the hypothesis that PBM therapy may be an important tool for DPN treatment. Herein, we evaluated the effects of PBM in an experimental model of diabetic neuropathy in mice, as well as some of the mechanisms involved in this effect.

2 | METHODS

2.1 | Animals

Male C57BL6 mice weighing 20–26 g, age-matched, were used throughout this study. Animals were maintained under

controlled light cycle (12/12 h) and temperature ($2T \pm 2^\circ C$) with free access to food and water. Throughout the experiments, animals were managed using the principles and guidelines for the care of laboratory animals in studies involving pain and were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at University of São Paulo (CEUA, protocol number 022/2014). Animals were divided in four groups: (1) diabetic animals and treated with PBM (STZ + PBM); (2) diabetic animals and treated with sham irradiation (STZ Sham); (3) animals injected with saline and treated with PBM (SAL + PBM); and (4) animals injected with saline and treated with sham irradiation (SAL Sham). After the experiments, animals were euthanized and discarded according to routine laboratory procedures.

2.2 | Diabetic peripheral neuropathy experimental model

Mice received a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ; 225 mg/kg, body weight; Sigma, St. Louis, MO) dissolved in sterile 0.9% saline after 4 h of food restriction. Control animals received only sterile 0.9% saline injection. Fasting blood glucose levels were measured, after a fasting period of 4 h, by glucometer (ACCU-CHEK, Roche Diagnostics, Buenos Aires, Argentina) before STZ or Sal injection and again on days 7, 14, 21 and 35 after STZ. Mice whose blood glucose levels exceeded 300 mg/dL were considered diabetic [20, 21]. Weight loss due to the metabolic dysfunction was verified weekly. Only diabetic mice were maintained in the subsequent experiments.

2.3 | Assessment of mechanical sensitivity

Testing for mechanical sensitivity (von Frey filaments Touch-Test Sensory Evaluators, North Coast Medical, Morgan Hill, CA) was based on method of Chaplan [22]. Mice were placed individually in plastic cages with a wire bottom, which allowed access to their paws. Filaments were applied to the plantar region of the left hind paw of each animal for 5 s. To reduce stress, mice were habituated to the experimental environment 1 day before the first measurement. The mechanical sensitivity measurements were accessed before de STZ injection (day 0) and after 7, 14, 21 and 35 days of STZ administration.

2.4 | Light source, dose and treatment

A low-level semiconductor InGaAlP (Photon Lase III, D.M.C., São Carlos, Brazil), operating with a wavelength of red 660 nm, was used through the experiments with a beam spot of 0.28 cm² and an output power of 30 mW, energy density of 1.6 J/cm² and exposure time of 15 s in a continuous frequency. Laser doses, low enough to avoid any thermal effects, were chosen based on previous studies from our group. Laser was applied to the plantar region of the left

FIGURE 1 Effect of PBM on blood glucose levels and body weight of diabetic mice. Blood glucose levels (A) and body weight (B) were monitored prior to any treatment (time 0), 7, 14, 21 and 35 days after STZ or SAL injection. Data correspond to the mean $\pm$ SEM of 7 to 9 mice per group. ** $P < .01$, *** $P < .001$ STZ Sham group; ## $P < .01$ STZ + PBM group compared to the SAL Sham and SAL + PBM groups; ### $P < .001$ group STZ + PBM in comparison with SAL Sham and SAL + PBM groups (two-way ANOVA, followed by Bonferroni test)

hind paw of each animal, in the same place as von Frey filaments.

2.5 | Pharmacological treatments

Naloxone hydrochloride (NLX; 10 mg/kg i.p.; Tocris Bio-science (Bristol, England, UK), CAS number 357-08-4)-a broad spectrum opioid receptor antagonist was dissolved in sterile 0.9% saline and injected into 2 distinct protocols. For the evaluation of opioid participation in the acute PBM effect, the injection was performed 30 min after the first laser application, so that the peak of drug activity (30 min after injection) corresponded to the observed analgesic peak of PBM (1 h after PBM first application). For the study of the participation of endogenous opioids in the chronic effect of PBM, naloxone was injected after 21 PBM sessions, and the assessment of mechanical allodynia was performed 30 min after the injection of the antagonist.

Naloxone methiodide (NLX MET; 10 mg/kg i.p.; Sigma (St Louis, Missouri), CAS number 93302-47-7) is also a nonselective antagonist at opioid receptors which does not cross the blood–brain barrier, which means that it has limited access to the brain [23], was dissolved in sterile 0.9% saline, the injection was performed as same protocol as NLX hydrochloride for evaluation of opioid participation in the acute PBM effect.

2.6 | Transmission electron microscopy

Left sciatic nerve from 4 to 6 mice per group after 21 days of PBM treatment were removed after perfusion using modified Karnovsky solution according to Cury et al. [24]. Samples were then immersed in 1% osmium tetroxide at 4°C for 2 h, rinsed and dehydrated in a grade series of alcohol (70%–100%, 15 min each) followed by 2 stages in propylene oxide for the same time and embedded in Spurr's resin.

FIGURE 2 Effect of PBM treatment on mechanical sensitivity of mice, evaluated by von Frey filaments. Animals were evaluated for mechanical sensitivity before any procedure (time 0) and 14 days after STZ. (A) On the 14th day, mice received the first application of PBM and were evaluated after 1, 3, 6 and 24 h of the first application. (B) Consecutive application of PBM was also evaluated after 7 and 21 days. Data correspond to the mean $\pm$ SEM of 12 mice per group. ** $P < .01$, *** $P < .001$, STZ Sham group compared to the SAL Sham group; ## $P < .01$ STZ + PBM group compared to the STZ Sham group; * $P < .05$, **** $P < .0001$ STZ Sham and STZ + PBM compared to the SAL Sham group; # $P < .05$, ##### $P < .0001$ STZ + PBM group compared to the STZ Sham group (two-way ANOVA, followed by Bonferroni post-test)

FIGURE 3 Effect of naloxone injection on PBM-induced antinociception of diabetic mice, evaluated by von Frey filaments. Animals were evaluated before any procedure (time 0), 14 or 35 days after STZ injection. (A) Naloxone hydrochloride (NLX; 10 mg/kg) or (B) Naloxone methiodide (NLX MET; 10 mg/kg) were injected intraperitoneal on the 14th day after STZ injection, 30 min before PBM application. Behavioral testing by von Frey filaments was performed 1 h after PBM application. (C) Diabetic mice received 21 consecutive applications of PBM. NLX was injected on the day 35 after STZ injection 1 h before the last PBM application. Mechanical sensitivity was evaluated by von Frey filaments 1 h after the last application of PBM. Data correspond to the mean $\pm$ SEM of 4 to 7 animals per group. ### $P = .0002$, STZ + PBM compared to the STZ + PBM + NLX group; # $P < .05$ STZ Sham compared to STZ + PBM + NLX; ## $P < .01$ and *** $P < .001$, STZ + PBM and STZ + PBM + NLX compared to the STZ Sham and STZ Sham + NLX groups; * $P < .05$, STZ + PBM + NLX MET compared to the STZ Sham group (two-way ANOVA, followed by Bonferroni post-test)

Ultrathin sections (60 nm) were collected on copper grids, counterstained with saturated uranyl acetate for 5 min and 0.4% lead citrate for 3 min. Analysis were realized using a Jeol 1010 electron microscopy at 80 kV.

2.7 | Enzyme-linked immunosorbent assay

For protein extraction, the left sciatic nerves were removed from 4 to 7 mice per group (totalizing 19 samples) and homogenized in 100 μ L of a cold lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitor (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Followed by a centrifugation at 10 000g at 15 min (4°C), from supernatants the total protein quantification using DC-ProteinAssay (BioRad, USA) kit of each sample was done. NGF levels were assessed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (NGF Emax Immuno Assay System, Promega, Madison, Wisconsin) according to the manufacturer's instructions. NGF concentrations were determined by interpolation with standard curves assayed on individual plates and normalized to protein content in each sample.

2.8 | Western blot analysis

Sciatic nerve of the left paw of 6 mice from each group (control, diabetic and treated animals) were removed and rapidly frozen in liquid nitrogen, after that, the tissue was lysed in extraction buffer (0.625% Nonidet P-40, 0.625% [wt/vol] sodium deoxycholate; 0.00625 M sodium phosphate, pH 7.2; 1 mM Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), pH 8) and for the extraction procedure was added inhibitors of phosphatase and protease, using sonicator (75% amplitude). The amount of proteins was determined by the Bradford method (BioRad, USA). Subsequently, 50 μ g of protein was submitted to electrophoresis on 10% Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to a nitrocellulose membrane, which was blocked with Tris-buffered saline (TBS-T) solution (0.1% Tween 20) with Bovine serum albumin (BSA) 5% for 1 h at room temperature and later, incubated with blocking solution (BSA 5% in TBS-T) with the primary antibodies Parkin (AB 179812) (1:1000), Vdac2 (AB37985) (1:1000), β -Tubulin (2146 s) (1:2000), overnight 4°C. Secondary antibodies (donkey-antigen IgG, goat-antirabbit IgG) were

FIGURE 4 Effect of PBM on nerve growth factor levels in the sciatic nerve of STZ-diabetic mice. Samples of sciatic nerves were removed after 35 days of STZ injection and 21 consecutive applications of PBM and were submitted to NGF evaluation by ELISA. Data correspond to the mean T SEM of 3 to 7 animals per group. # $P = .0133$ compared to the STZ Sham group (unpaired t test)

incubated in TBS-T solution at a concentration of 1:30 000 for 1 h. The densitometry analyzes were obtained with the VisionCapt software.

2.9 | Statistical analyses

Results are presented as the mean $\pm$ SEM. Statistical analyses of data were generated using GraphPad Prism, version 6.0 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA). Statistical comparison of more than 2 groups was performed using analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's test. Statistical comparison for treatment over time was performed using two-way ANOVA followed by Bonferroni's test. In all cases, $P < .05$ was considered statistically significant.

3 | RESULTS

3.1 | PBM inhibits mechanical sensitivity of diabetic mice

STZ induced an increase in blood glucose levels detected 7 days after its injection, and was maintained throughout the experimental period (Figure 1A). PBM therapy did not interfere with blood glucose levels neither in the STZ or in the control group of mice injected with saline. A decrease in body

FIGURE 5 Frequency of axoplasm-myelin separation of the sciatic nerve of mice after 21 days of PBM treatment. Samples of sciatic nerves were removed after 35 days of STZ injection and 21 consecutive applications of PBM and were submitted to transmission electron microscopy evaluation. (B/D) A significant increase on axoplasm-myelin separation (white arrow) and the presence of cytoplasmic debris (black arrow) was observed in STZ-mice when compared to the SAL control group of animals (A/D). PBM treatment completely reversed this effect (C/D). Ultrastructural images demonstrate the axoplasm-myelin separation in all evaluated groups (A-C; 2.5K). Quantitative morphological analysis was performed by Image J. Data correspond to the mean $\pm$ SEM of 100 neurons per group. * $P < .05$ STZ Sham group compared to the SAL Sham group, # $P < .05$ STZ PBM compared to the STZ Sham group (one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test)

FIGURE 6 Effect of PBM on the number of C fibers in the sciatic nerve of diabetic mice after 21 days of PBM treatment. Samples of sciatic nerves were removed after 35 days of STZ injection and 21 consecutive applications of PBM and were submitted to transmission electron microscopy evaluation. (B/D) A significant decrease of C fiber count was observed in STZ-mice when compared to the SAL control group of animals (A/D). PBM treatment partially increased the number of C fiber (C/D). Ultrastructural images demonstrate the amount of C fiber in all evaluated groups (A-C; 2.5K). Area is equivalent to 3235.68 µm². Quantitative morphological analysis was performed by Image J. Data correspond to the mean $\pm$ SEM. * $P < .05$ STZ Sham compared to the SAL Sham group (one-way ANOVA, followed by Bonferroni test)

weight was also observed in STZ-injected animals that was not prevented by PBM application when compared with the control group of mice injected with saline (Figure 1B). After 14 days of STZ injection, DPN development was evidenced by the significant decrease of the mechanical nociceptive thresholds of diabetic animals, that remained for all evaluated times (STZ Sham: 0.112 ± 0.025 ; STZ + PBM: 0.092 ± 0.020 , $n = 11$) (Figure 2A). A single application of PBM therapy was able to reverse the observed mechanical sensitivity at the first hour of evaluation (STZ + PBM: 1 h 0.934 ± 0.191 , $n = 11$) when compared to the group of mice that received Sham irradiation (STZ Sham: 1h 0.248 ± 0.099 , $P = .0024$, $n = 11$), decreasing at subsequent times (Figure 2A). Continuous treatment with PBM maintained the antinociceptive effect evaluated both after 7 (STZ Sham: 0.072 ± 0.005 ; STZ + PBM: 0.965 ± 0.148 , $n = 12$, $P < .0001$) and 21 days (STZ Sham: 0.261 ± 0.144 ; STZ + PBM: 0.811 ± 0.120 , $n = 12$, $P = .0112$) of treatment (Figure 2B). No changes on mechanical sensitivity was observed for the saline group of mice treatment with PBM (Figure 2B).

3.2 | PBM-induced antinociception is mediated by central opioids

To investigate the involvement of opioids on PBM-induced antinociception, STZ mice were treated with NLX prior to PBM. Results demonstrate that NLX reversed PBM-induced antinociception 1 h after its application observed by the differences of the threshold responses between the different groups (1 h—STZ: 0.088 ± 0.021 , $n = 4$; STZ + PBM: 0.722 ± 0.191 , $n = 7$; STZ + PBM + NLX: 0.086 ± 0.012 , $n = 6$; $P = .0002$) (Figure 3A). To confirm whether this was a central or peripheral effect, a group of STZ mice received naloxone methiodide (STZ MET) prior to PBM treatment. Results demonstrate that NLX MET was not able to reverse PBM-induced antinociception when compared with the group of mice that did not receive naloxone (1 h—STZ: 0.412 ± 0.154 , $n = 4$; STZ + PBM: 1.177 ± 0.120 , $n = 6$; STZ + PBM + NLX: 1.415 ± 0.365 , $n = 5$; $P > .9999$) thus confirming that PBM-induced antinociception on diabetic mice depends on the release of central opioids (Figure 3B). In addition, opioidergic mediation is restricted to the acute phase of the PBM effect, once the injection of NLX after

FIGURE 7 Effect of PBM on the number of mitochondria in the sciatic nerve of diabetic mice after 21 days of PBM treatment. Samples of sciatic nerves were removed after 35 days of STZ injection and 21 consecutive applications of PBM and were submitted to transmission electron microscopy evaluation. (B/D) A significant decrease of mitochondria count was observed in STZ-mice when compared to the SAL control group of animals (A/D). PBM treatment significantly increased the number of mitochondria (C/D). Ultrastructural images demonstrate the amount of mitochondria in all evaluated groups (A-C; 7.5K). Area is equivalent to 3235.68 μm^2 . Quantitative morphological analysis was performed by Image J. Data correspond to the mean $\pm$ SEM. * $P < .05$ STZ Sham compared to the SAL Sham group, ## $P < .01$ STZ + PBM compared to the STZ Sham group (one-way ANOVA, followed by Bonferroni test)

21 consecutive applications of PBM did not reverse the observed antinociception, suggesting that different mechanisms are involved on acute and chronic PBM-induced antinociceptive effect (1 h—STZ: 0.068 ± 0 , $n = 4$; STZ + PBM: 1.199 ± 0.200 , $n = 4$; STZ + PBM + NLX: 1.160 ± 0.389 , $n = 3$; $P = .8430$) (Figure 3C).

3.3 | PBM induces morphological changes on the sciatic nerve of diabetic mice

Effects of PBM on the sciatic nerve of STZ-mice were also evaluated. PBM treatment increased NGF levels after 21 consecutive applications of PBM therapy when compared to the group of mice that did not receive the treatment (STZ: 0.008 ± 0.001 , $n = 3$; STZ + PBM: 0.016 ± 0.002 , $n = 5$; $P = .0133$) (Figure 4). Also, morphological analysis of the sciatic nerve by transmission electron microscopy demonstrated that STZ induced myelin degeneration with the presence of cytoplasmic debris (Figure 5B) that was prevented by PBM application (Figure 5C). A quantitative analysis demonstrated an expressive increase (46.67%) of axoplasm-

myelin separation frequency in the group of STZ animals when compared to SAL NT group (Figure 5D). PBM therapy significantly decreased axoplasm-myelin separation after 21 consecutive applications (SAL: 7.333 ± 5.457 , STZ: 54.14 ± 14.05 , STZ + PBM: 11.25 ± 2.529 ; $P = .0086$) (Figure 5C). STZ treatment also induced a significant decrease in the number of unmyelinated C fibers when compared to control group animals (SAL: 76.00 ± 5.00 , STZ: 43.17 ± 7.78 , $P = .0239$) that was partially reversed by PBM (STZ + PBM: 61.43 ± 5.374) (Figure 6). Moreover, PBM treatment induced an increase on mitochondrial count in the sciatic nerve of diabetic mice (SAL: 90.29 ± 5.357 , STZ: 60.82 ± 2.915 , STZ + PBM: 89.90 ± 7.591 , $n = 5$; $P = .0040$) (Figure 7). However, no significant changes on VDAC2 expression was observed in the sciatic nerve of PBM-treated mice (Figure 8A). Finally, PBM treatment significantly decreased in Parkin expression in the sciatic nerve of PBM-treated mice (SAL: 1.042 ± 0.046 , STZ: 0.965 ± 0.069 , STZ + PBM: 0.7138 ± 0.040 , $n = 5$; $P = .0025$) thus reinforcing the hypothesis that PBM is able to modulate mitochondrial autophagic system (Figure 8B).

FIGURE 8 Effect of PBM on VDAC2 and Parkin expression in the sciatic nerve of diabetic mice after 21 days of PBM treatment. Samples of sciatic nerves were removed after 35 days of STZ injection and 21 consecutive applications of PBM and were submitted to VDAC2 (A) and Parkin (B) protein expression evaluated by immunoblotting. β -Tubulin was used as a protein-loading control. Data correspond to the mean $\pm$ SEM of the average intensity of VDAC2 or Parkin of 5 samples per group. * $P < .05$ STZ Sham compared to the STZ + PBM group, *** $P < .001$ SAL Sham compared to STZ + PBM group (one-way ANOVA, followed by Bonferroni test)

4 | DISCUSSION

In this study, the antinociceptive effects of PBM on an experimental model of diabetic neuropathy as well as the mechanisms involved were evaluated. Results presented herein demonstrate that STZ-induced diabetic mice showed a decrease in mechanical nociceptive threshold 14 days after its injection when compared to nondiabetic mice, in all evaluated period.

These data corroborate with data from the literature describing the administration of STZ as a suitable pharmacological model for the induction of type 1 diabetes in rodent models [25] as well as with data from our group demonstrating that STZ induces a decrease on painful mechanical sensitivity of diabetic mice [26]. STZ-induced diabetes model mimics diabetes mellitus in animals and the signs of neuropathy develop rapidly, once a single dose of STZ induces strong pancreatic β -cells degeneration close to total ablation, inducing type 1 diabetes mellitus [27]. Painful neuropathy was evidenced by the significant decrease of mechanical nociceptive thresholds of mice after 14 days of STZ injection. This neurotoxic effect of STZ is exclusively attributed to hyperglycemia, once STZ does not cause neuropathy [20]. Also, a progressive increase in blood glucose level and decreased body weight could also be observed in the diabetic mice in the present study different from that seen in control saline group of mice that did not show any changes in blood glucose level and body weight.

A single application of PBM, 14 days after STZ injection, blocked mechanical hypersensitivity up to 1 h of evaluation, decreasing on subsequent times. On the other hand, daily applications of PBM maintained the observed antinociception for all evaluated period thus suggesting that continuous applications of PBM are needed to achieve a better level of antinociceptive effect. These data corroborate with data from the literature demonstrating that 660 nm wavelength is able of stimulating wound healing in diabetic mice [28] and induces antinociception in rodents submitted to experimental models of neuropathic pain [29–31]. Also, although PBM treatment was effective in reversing nociception, no changes were observed regarding the blood glucose levels or body weight of animals, which continued to progress with the development of diabetes. Moreover, PBM treatment by itself did not cause any changes in the control group of animals, reinforcing the fact that PBM was specific in treating painful neuropathy. These results corroborate with data from the literature demonstrating that PBM has a direct effect in inhibiting nociception in mice [32].

To better understand the effects of PBM in decreasing nociception, the involvement of opioids was evaluated. We found that central opioids are involved on the acute but not in chronic effect of PBM. These data are in agreement with other studies demonstrating that analgesia resulting from treatment with PBM is related to an increase in the activity of endogenous opioids [19, 33]. On the other hand, the non-reversal of nociception at the end of chronic treatment suggests that PBM treatment may be inducing permanent neuroplastic changes that maintain the antinociceptive state, without, however, depending on the release of opioids in the periphery.

One hypothesis would be that PBM-treatment might be inducing a healing process in the periphery reversing the nociceptive picture. That hypothesis can be reinforced by the data

presented herein demonstrating that PBM increased NGF levels in the sciatic nerve of diabetic mice after 21 days of continuous application. Considering the protective role of this neurotrophin, this increase is essential for the regeneration and survival of peripheral fibers [34], contributing to the observed outcome, sustaining the therapeutic effect of PBM on NPD.

Moreover, a significant improvement of myelin morphology and metabolism in the sciatic nerve of diabetic mice was observed. In addition to the decrease on axoplasm-myelin separation and increased C fibers count, herein it was demonstrated, for the first time, that PBM increases the total number of mitochondria in diabetic mice and improves their metabolic state demonstrated by the decrease in Parkin levels. Once Parkin is involved in mitophagy, the process by which damaged mitochondria undergo autophagy [35, 36], it is plausible to speculate that PBM regulates mitochondrial metabolism inducing a direct protecting or repairing effect on diabetic-treated mice.

In conclusion, our data demonstrates that PBM exhibits antinociceptive properties on diabetes-induced peripheral neuropathy by restoring axonal morphology and mitochondrial functionality in mice. Although the mechanisms involved in the effects of PBM need to be further characterized, the results presented herein reinforce the role of PBM as a complementary tool for the treatment of diabetic painful neuropathy.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by FAPESP (grants #2014/03270-1, #2015/17136-8 and #2016/10372-0). We would like to thank Professor Anselmo Sigari Moriscot from the Department of Anatomy of the University of São Paulo for the VDACC2 and Parkin antibodies.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

ORCID

Camila S. Dale <http://orcid.org/0000-0002-3421-7799>

REFERENCES

- [1] K. G. M. M. Alberti, P. Z. Zimmet, *Diabet. Med.* 1998, 15, 539.
- [2] G. Said, *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2007, 3, 331.
- [3] International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 8th ed. (Eds: S. Karuranga, J. da Rocha Fernandes, Y. Huang, B. Malanda). Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017. <http://www.diabetesatlas.org>.
- [4] C. C. Toth, N. M. Jedrzejewski, C. L. Ellis, W. H. Frey, *Mol. Pain* 2010, 6, 1.
- [5] A. M. Vincent, B. C. Callaghan, A. L. Smith, E. L. Feldman, *Nat. Rev. Neurol.* 2011, 7, 573.
- [6] A. J. M. Boulton, A. I. Vinik, J. C. Arezzo, V. Bril, E. L. Feldman, R. Freeman, R. A. Malik, R. E. Maser, J. M. Sosenko, D. Ziegler, *Diabetes Care* 2005, 28, 956.
- [7] H. T. Cheng, J. R. Dauch, S. S. Oh, J. M. Hayes, Y. Hong, E. L. Feldman, *Mol. Pain* 2010, 6, 1.
- [8] B. S. Galler, *Neurology* 1995, 45, S17.
- [9] N. Attal, *Clin. J. Pain* 2000, 16, 118.
- [10] D. W. Y. Sah, M. H. Ossipov, F. Porreca, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003, 2, 460.
- [11] G. I. Klebanov, M. V. Kreinina, E. A. Poltanov, T. V. Khristoforova, Y. A. Vladimirov, *Bull. Exp. Biol. Med.* 2001, 131, 239.
- [12] P. Gál, M. Mokry, B. Vidinsky, R. Kilik, F. Depta, M. Harakalová, F. Longauer, S. Mozeš, J. Sabo, *Lasers Med. Sci.* 2009, 24, 539.
- [13] T. Albrektsson, H. A. Hansson, *Biomaterials* 1986, 7, 201.
- [14] L. J. Walsh, *Aust. Dent. J.* 1997, 42, 302.
- [15] S. Rochkind, V. Drory, M. Alon, M. Nissan, G. E. Ouaknine, *Photomed. Laser Surg.* 2007, 25, 436.
- [16] J. T. Hashmi, Y. Huang, B. Z. Osmani, S. K. Sharma, M. A. Naeser, M. R. Hamblin, *PM R* 2010, 2, 1.
- [17] D. de Oliveira Martins, F. M. Santos, M. E. Oliveira, L. R. G. Britto, J. B. D. Lemos, M. Chacur, *Neurotrauma* 2013, 30, 480.
- [18] M. E. Khamseh, N. Kazemikho, R. Aghili, B. Forough, M. Lajevardi, F. H. Dabaghian, A. Goushegiri, M. Malek, *Lasers Med. Sci.* 2011, 26, 831.
- [19] S. Hagiwara, H. Iwasaka, K. Okuda, T. Noguchi, *Anesth. Analg.* 2008, 107, 1058.
- [20] E. Davidson, L. Coppey, B. Lu, V. Arballo, N. A. Calcutt, C. Gerard, M. Yorek, *Exp. Diabetes Res.* 2009, 2009, 431980.
- [21] L. Coppey, E. Davidson, B. Lu, C. Gerard, M. Yorek, *Neuropharmacology* 2011, 60, 259.
- [22] S. R. Chaplan, F. W. Bach, J. W. Pogrel, J. M. Chung, T. Yaksh, *J. Neurosci.* 1994, 14, 55.
- [23] T. Lewanowitsch, R. J. Irvine, *Brain Res.* 2003, 964, 302.
- [24] D. P. Cury, F. J. Dias, M. A. Miglino, I. Watanabe, *PLoS One* 2016, 11, 1.
- [25] A. S. Hidmark, P. P. Nawroth, T. Fleming, *J. Neuroimmunol.* 2017, 306, 76.
- [26] E. F. Toniolo, A. C. Franciosi, C. S. Dale, *J. Diabetes Metab.* 2014, 5, 4.
- [27] Y. Cheng, H. Kang, J. Shen, H. Hao, J. Liu, Y. Guo, Y. Mu, W. Han, *Sci. Rep.* 2015, 5, 1.
- [28] P. V. Peplow, T. Chung, G. D. Baxter, *Lasers Surg. Med.* 2012, 44, 26.
- [29] A. Janzadeh, F. Nasirinezhad, M. Masoumipour, S. B. Jameie, P. Hayat, *Lasers Med. Sci.* 2016, 31, 1863.
- [30] M. Masoumipour, S. B. Jameie, A. Janzadeh, F. Nasirinezhad, M. Soleimani, M. Kerdary, *Lasers Med. Sci.* 2014, 29, 1593.
- [31] Y. L. Hsieh, L. Chou, P. Chang, C. Yang, M. Kao, C. Hong, *J. Comp. Neurol.* 2012, 520, 2903.
- [32] A. K. Ketz, K. R. Byrnes, N. E. Grunberg, C. E. Kasper, L. Osborne, B. Pryor, N. L. Tosini, X. Wu, J. J. Anders, *Pain Med.* 2016, 0, 1.
- [33] A. Honmura, A. Ishii, M. Yanase, J. Obata, E. Hakuri, *Lasers Surg. Med.* 1993, 13, 463.
- [34] G. Pittenger, A. Vinik, *Exp. Diabetes Res.* 2003, 4, 271.
- [35] R. J. Youle, D. P. Narendra, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2011, 12, 9.
- [36] S. Sifuentes-Franco, F. P. Pacheco-Moisés, A. D. Rodríguez-Carrizalez, A. G. Miranda-Díaz, *J. Diabetes Res.* 2017, 2017, 1673081.

How to cite this article: da Silva Oliveira VR, Cury DP, Yamashita LB, et al. Photobiomodulation induces antinociception, recovers structural aspects and regulates mitochondrial homeostasis in peripheral nerve of diabetic mice. *J. Biophotonics*. 2018; e201800110. <https://doi.org/10.1002/jbio.201800110>