

Mara Evany de Oliveira Silva

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

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

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Marucia Chacur

Versão original

São Paulo

2019

RESUMO

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

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

Palavras chaves: Hiperalgisia. Dor Neuropática. Laser de baixa intensidade. Substância P. TRPV1. NGF. Proteína zero.

ABSTRACT

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOR NEUROPÁTICA

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

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

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

Diversos estudos clínicos e experimentais visam elucidar os mecanismos envolvidos na dor neuropática, devido essa dor ser persistente mesmo após a retirada do estímulo nociceptivo, e pode ocorrer mesmo quando esse estímulo é indetectável. A dor neuropática pode ocorrer devido alterações nos neurônios e nas fibras que conduzem a informação nociceptiva (Thacker, 2007). Contudo as respostas dos pacientes portadores de dor neuropática não apresentam resultados satisfatórios com as terapêuticas convencionais, devido a esses não combaterem a dor de forma eficaz. Tratamento como: ablação neural, medicamentosos como, ansiolíticos, antidepressivos, anticonvulsivantes, administração sistêmica de anestésicos, analgésicos narcóticos e não narcóticos (Galer, 1995; Sah et al., 2003). Nesse sentido nas últimas décadas tratamentos não medicamentosos como Laser foi utilizado como adjuvante ao tratamento convencional e tem se mostrado eficaz no controle das mais diversas

síndromes álgicas, com, por exemplo, no controle da dor lombar crônica, neuralgia trigeminal entre outras (Bjordal et al., 2003; Martins et al., 2013; Medalha et al., 2012).

1.2 O uso do LASER como potencial terapêutico

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ainda, há relatos na literatura do efeito benéfico do LBI na regeneração de nervos periféricos, bem como na melhora da locomoção. No estudo feito por Medalha et al. (2012), em ratos com ressecção completa do nervo isquiático e irradiados com LBI 24 horas após a lesão, os animais foram submetidos á quinze sessões de laserterapia,

observou-se melhora na locomoção por meio do teste do índice funcional do isquiático (IFC) o que constata que o Laser também age regeneração periférica (Medalha et al., 2012).

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

1.3 Lesão nervosa periférica

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

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

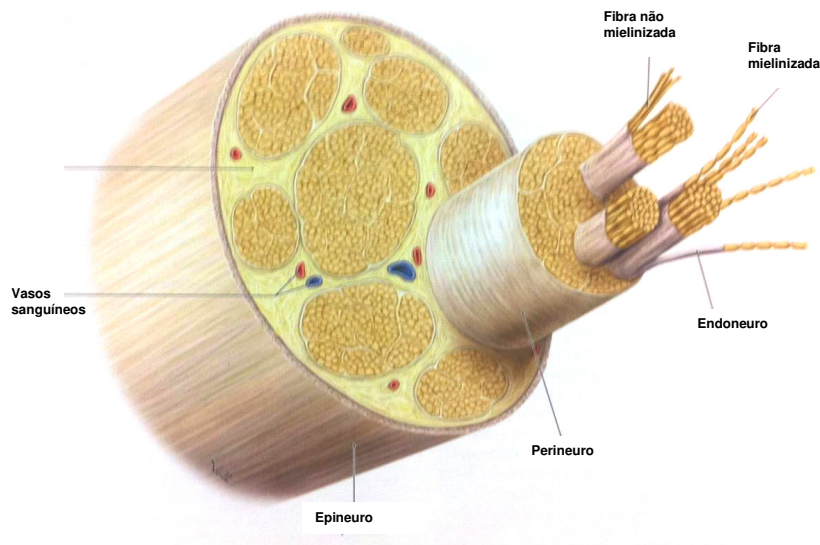


Figura 1 – Corte transversal mostrando os revestimentos dos nervos periféricos.

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

Após ocorrer uma lesão no nervo periférico, podemos observar alguns processos regenerativos protagonizados por meio de fagocitose (macrófagos), onde ocorre degeneração dos axônios. Durante esse processo células de *Schwann* em constante proliferação seguido de síntese de fatores de crescimento no coto proximal desse axônio, formam uma ponte de fibrina para que os cotos sejam conectados. Subsequente irá ocorrer o brotamento do axônio proximal para o axônio distal, e com isso ocorre à mielinização dos axônios pelas células de *Schwann* (Beaulieu et al., 1988; Delmotte et al., 2009; Hunt; Mantyh, 2001; Sah et al., 2003).

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

Para que se restabeleça a comunicação ao longo do nervo é necessário seu crescimento, e para isso são necessárias proteínas que irão desempenhar o crescimento e diferenciação do tecido nervoso, dentre essas proteínas está fator de crescimento neural

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

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

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

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

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

Além do NGF as células de *Schwann* também participam do processo de reparação dos nervos periféricos. Cada axônio é revestido de camadas lipídicas que dão origem a bainha de mielina, essa camada constituída por lipídios isola eletricamente os

axônios propiciando que a condutibilidade do impulso elétrico seja aumentada (Chavez, 1997; Fox, 2007; Tortora, 2007). O isolamento propiciado pelo envolvimento da célula de *Schwann* no axônio se dá por meio da membrana plasmática que é dependente de moléculas adesivas que mantêm membrana basal e axônio bem aderidos.

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

Essa proteína é responsável pela formação da bainha de mielina que por sua vez envolvem os axônios proporcionando assim uma condução mais rápida dos sinais elétricos (Rotenstein et al., 2008). Já o fator de crescimento neural atua promovendo a diferenciação e proliferação de neurônios modulando a reparação dos nervos lesionados, e promove ainda a extensão dos axônios e mielinização dos cotos periféricos proximais (Zochodne, 2000).

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

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

Portanto, diferentes métodos terapêuticos, vêm sendo utilizados para facilitar esse processo. Na fisioterapia é comum a utilização de técnicas não invasivas como: ultra-som, mobilização neural e a fotobioestimulação, que além de propiciar efeito

analgésico também colabora para o crescimento neural (Anders et al., 2004; Oliveira et al., 2017b).

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

Após a lesão do nervo periférico, ocorre um aumento da expressão dos receptores de TRPV1 nos neurônios mielinizados, e essa alteração contribui para o desenvolvimento da hiperalgesia (Ueda, 2006). O receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) é constituído por seis domínios transmembrânicos, sendo encontrado na membrana celular e no retículo sarcoplasmático. Sendo esse um receptor de capsaicina (encontrado na pimenta) e nos neurônios dos gânglios das raízes posteriores (DRG's) esse receptor desempenha um papel na sinalização de dor, sensibilizando assim o neurônio aferente primário que por sua vez despolariza os neurônios de segunda ordem (Nakanishi et al., 2010; Staaf et al., 2010). O aumento da expressão dessa proteína está relacionado ao desenvolvimento de hiperalgesia térmica e alodinia, e conseqüentemente também estão envolvidos com a dor neuropática. Estudos apontam que o bloqueio dos receptores de TRPV 1 revertem o quadro de hiperalgesia e alodinia (Vilceanu et al., 2010). Ainda, estudos mostram que o TRPV1 responde a outros estímulos como, por exemplo, agentes pró inflamatórios endógenos como, o fator de crescimento neural (NGF), histamina, bradicinina entre outros, além de alterações de pH provocados por lesões (pH 5,2) bem como, alteração da temperatura corporal (>43 C°) (Chuang et al., 2001; Zhang et al., 2005).

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

Com relação à substância P (SP), ela é um neuropeptídeo que age em receptor NK1, sendo encontrado principalmente no encéfalo, e acoplado a proteína G. Estudos

realizados evidenciaram que neurônios do tipo C, ou seja, não mielinizados que estão no gânglio da raiz posterior são sensíveis para SP, ainda em outro estudo foi possível observar o envolvimento do receptor NK1 em modelo de dor Neuropática induzido por constrição crônica do nervo isquiático, o que levou os cientistas a acreditarem que a SP é responsável pela hipernocicepção em ratos, ainda quando bloqueados o receptor esse quadro é revertido (Bie; Zhao, 2011; Hökfelt, 1991), Cahill, Coderre, 2002).

Porém é controversa a ação da SP na dor, estudos indicam uma diminuição da imunoreatividade no DRG após uma axotomia, em contra partida outros estudos indicam um aumento da imunoreatividade da SP no DRG após lesão parcial do nervo (Lagraize et al., 2010; Ma; Bisby, 1998; Mansikka et al., 2000; Sapunar et al., 2012; Ueda, 2006). Baseados no efeito dual deste mediador resolvemos avaliar o papel desta substância no nosso modelo experimental, visto que a SP é de extrema importância em fenômenos nociceptivos.

1.5 Justificativa e hipótese

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

A nossa hipótese de trabalho é que possivelmente os animais com dor neuropática crônica apresentem melhora nos comportamentos dolorosos, bem como

diminuição dos mediadores moleculares pró-nociceptivos, aumento do fator regenerativo no nervo e melhora da perfusão tecidual após a aplicação da laserterapia. O projeto foi realizado no laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor, que por sua vez, tem esta linha de pesquisa já consolidada, e realizaremos a técnica de Termografia Infravermelha com a colaboração do Dr. Marcos Leal Brioschi (Médico pesquisador do Centro de Dor do HC-FMUSP).

CONCLUSÃO

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

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

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

REFERÊNCIAS

- Aanonsen LM, Lei S, Wilcox GL. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. *Pain*. 1990; 41(3): 309-21.
- Aathimanikandan SV, Sandanaraj BS, Arges CG, Bardeen CJ, Thayumanavan S. Effect of guest molecule flexibility in access to dendritic interiors. *Org Lett*. 2005; 7(14): 2809-12.
- Abbott FV, Hong Y, Blier P. Persisting sensitization of the behavioural response to formalin-induced injury in the rat through activation of serotonin_{2A} receptors. *Neuroscience*. 1997; 77(2): 575-84.
- Abelev BI, Aggarwal MM, Ahammed Z, Amonett J, Anderson BD, Anderson M, Arkhipkin D, Averichev GS, Bai Y, et al. *Phys Rev Lett*. 2006; 97(25): 252001.
- Abraham J, Bardelay D, Kopp C, Kleinke JD, Bennion E. Education and debate: Making regulation responsive to commercial interests: streamlining drug industry watchdogs. *BMJ*. 2002; 325(7373): 1164-9.
- Abrahams MB, Friedman CP. Preclinical course-evaluation methods at U.S. and Canadian medical schools. *Acad Med*. 1996; 71(4): 371-4.
- Adam L, Laroche A, Barden A, Lemieux G, Pallotta D. An unusual actin-encoding gene in *Physarum polycephalum*. *Gene*. 1991; 106(1): 79-86.
- Adler V, Pincus MR, Polotskaya A, Montano X, Friedman FK, Ronai Z. Activation of c-Jun-NH₂-kinase by UV irradiation is dependent on p21ras. *J Biol Chem*. 1996; 271(38): 23304-9.
- Adori C, Kovacs GG, Low P, Molnar K, Gorbea C, Fellingner E, Budka H, Mayer RJ, Laszlo L. The ubiquitin-proteasome system in Creutzfeldt-Jakob and Alzheimer disease: intracellular redistribution of components correlates with neuronal vulnerability. *Neurobiol Dis*. 2005; 19(3): 427-35.
- Adrega da Silva C, Bernard F, Bardet JF. Caudal cervical arthrodesis using a distractable fusion cage in a dog. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2010; 23(3): 209-13.
- Adrega Da Silva C, Bernard F, Bardet JF, Theau V, Krimer PM. Fibrotic myopathy of the iliopsoas muscle in a dog. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2009; 22(3): 238-42.
- Akgul T, Gulsoy M, Gulcur HO. Effects of early and delayed laser application on nerve regeneration. *Lasers Med Sci*. 2014; 29(1): 351-7.
- Anand P, Foley P, Navsaria HA, Sinicropi D, Williams-Chestnut RE, Leigh IM. Nerve growth factor levels in cultured human skin cells: effect of gestation and viral transformation. *Neurosci Lett*. 1995; 184(3): 157-60.

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

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

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

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

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

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

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

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

Briani C, Adami F, Cavallaro T, Taioli F, Ferrari S, Fabrizi G. Axonal neuropathy due to myelin protein zero mutation misdiagnosed as amyloid neuropathy. *Muscle Nerve.* 2008; 38(1): 921-3.

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

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

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

Chavez DC. Efectos de la células de Schwann en la regeneración de tejido nervioso / Effects of the Schwann cells in the nerve tissue regeneration. *Rev. cient. (Bogotá).* 1997; 1: 65-8.

Chen YJ, Wang YH, Wang CZ, Ho ML, Kuo PL, Huang MH, Chen CH. Effect of low level laser therapy on chronic compression of the dorsal root ganglion. *PLoS One.* 2014; 9(3).

Chuang H, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns (4, 5) P₂-mediated inhibition. *Nature*. 2001; 411(6840): 957-61.

Cortright DN, Szallasi A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. *European Journal of Biochemistry*. 2004; 271(10): 1814-9.

de Oliveira Martins D, Martinez dos Santos F, Evany de Oliveira M, de Britto LR, Benedito Dias Lemos J, Chacur M. Laser therapy and pain-related behavior after injury of the inferior alveolar nerve: possible involvement of neurotrophins. *J Neurotrauma*. 2013; 30(6): 480-6.

Delmotte A, Rigoard S, Buffenoir K, Wager M, Giot J, Robert R, Lapierre F, Rigoard P. Physiology of the injured peripheral nerve]. *Neuro-Chirurgie*. 2009; 55: S13.

Dray A. The Pharmacology of Pain. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer; 1997. p. 21-41.

Ebrahimi H, Najafi S, Khayamzadeh M, Zahedi A, Mahdavi A. Therapeutic and Analgesic Efficacy of Laser in Conjunction With Pharmaceutical Therapy for Trigeminal Neuralgia. *J Lasers Med Sci*. 2018; 9(1): 63-8.

Ferreira MA. Efeitos do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização em ratos jovens e idosos: estudo morfométrico e morfológico. 1ª Ed, Altenas. 2006.

Fox IS. *Fisiologia Humana*. São Paulo: Manole; 2007.

Gravvanis AI, Tsoutsos DA, Tagaris GA, Papalois AE, Patralexis CG, Iconomou TG, Panayotou PN, Ioannovich JD. Beneficial effect of nerve growth factor-7S on peripheral nerve regeneration through inside-out vein grafts: an experimental study. *Microsurgery*. 2004; 24(5): 408-15.

Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *European Journal of Neuroscience*. 1999; 11(3): 946-58.

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

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

Hashmi JT, Huang YY, Sharma SK, Kurup DB, De Taboada L, Carroll JD, Hamblin MR. Effect of pulsing in low-level light therapy. *Lasers Surg Med*. 2010b; 42(6): 450-66.

Herzberg U, Eliav E, Dorsey JM, Gracely RH, Kopin IJ. NGF involvement in pain induced by chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Neuroreport*. 1997; 8(7): 1613-8.

- Hökfelt T. Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron*. 1991; 7(6): 867.
- Hunt SP, Mantyh PW. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2(2): 83-91.
- Hwang S, Valtschanoff J. Vanilloid receptor VR1-positive afferents are distributed differently at different levels of the rat lumbar spinal cord. *Neuroscience letters*. 2003; 349(1): 41-4.
- Jang SW, Svaren J. Induction of myelin protein zero by early growth response 2 through upstream and intragenic elements. *J Biol Chem*. 2009; 284(30): 20111-20.
- Lagraize S, Guo W, Yang K, Wei F, Ren K, Dubner R. Spinal cord mechanisms mediating behavioral hyperalgesia induced by neurokinin-1 tachykinin receptor activation in the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience*. 2010; 171(4): 1341-56.
- Ma W, Bisby MA. Increase of preprotachykinin mRNA and substance P immunoreactivity in spared dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injury. *Eur J Neurosci*. 1998; 10(7): 2388-99.
- Machado A. *Neuroanatomia Funcional*, 2. a edição, Ed, in Atheneu, 1993.
- Malcangio M, Ramer MS, Boucher TJ, McMahon SB. Intrathecally injected neurotrophins and the release of substance P from the rat isolated spinal cord. *Eur J Neurosci*. 2000; 12(1): 139-44.
- Mansikka H, Sheth R, DeVries C, Lee H, Winchurch R, Raja S. NERVE INJURY - INDUCED MECHANICAL BUT NOT THERMAL HYPERALGESIA IS ATTENUATED IN NEUROKININ - 1 RECEPTOR KNOCKOUT MICE. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2000; 5(4): 242-.
- Marinho RR, Matos RM, Santos JS, Ribeiro MA, Ribeiro RA, Lima RC, Jr., Albuquerque RL, Jr., Thomazzi SM. Potential anti-inflammatory effect of low-level laser therapy on the experimental reflux laryngitis: a preliminary study. *Lasers Med Sci*. 2014; 29(1): 239-43.
- Martins DD, Santos FM, Oliveira ME, Britto LR, Lemos JB, Chacur M. Laser therapy and the pain-related behavior after injury of the inferior alveolar nerve: possible involvement of neurotrophins. *J Neurotrauma*. 2012.
- Mashhoudi Barez M, Tajziehchi M, Heidari MH, Bushehri A, Moayer F, Mansouri N, Safavi Naini N, Movafagh A. Stimulation Effect of Low Level Laser Therapy on Sciatic Nerve Regeneration in Rat. *J Lasers Med Sci*. 2017; 8(Suppl 1): S32-S7.
- Masoumpoor M, Jameie SB, Janzadeh A, Nasirinezhad F, Soleimani M, Kerdary M. Effects of 660- and 980-nm low-level laser therapy on neuropathic pain relief following chronic constriction injury in rat sciatic nerve. *Lasers Med Sci*. 2014; 16: 16.
- Medalha CC, Di Gangi GC, Barbosa CB, Fernandes M, Aguiar O, Faloppa F, Leite VM, Renno AC. Low-level laser therapy improves repair following complete resection of the sciatic nerve in rats. *Lasers Med Sci*. 2012; 27(3): 629-35.

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

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

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

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

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

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

Nakanishi M, Hata K, Nagayama T, Sakurai T, Nishisho T, Wakabayashi H, Hiraga T, Ebisu S, Yoneda T. Acid activation of Trpv1 leads to an up-regulation of calcitonin gene-related peptide expression in dorsal root ganglion neurons via the CaMK-CREB cascade: a potential mechanism of inflammatory pain. *Molecular biology of the cell.* 2010; 21(15): 2568-77.

Oliveira ME, Santos FM, Bonifacio RP, Freitas MF, Martins DO, Chacur M. Low level laser therapy alters satellite glial cell expression and reverses nociceptive behavior in rats with neuropathic pain. *Photochem Photobiol Sci.* 2017a; 26(10).

Oliveira ME, Santos FM, Bonifacio RP, Freitas MF, Martins DO, Chacur M. Low level laser therapy alters satellite glial cell expression and reverses nociceptive behavior in rats with neuropathic pain. *Photochem Photobiol Sci.* 2017b; 16(4): 547-54.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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