

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Francisco José Cidral Filho

**TERAPIA POR DIODO EMISSOR DE LUZ PROMOVE  
ANTIHIPERSENSIBILIDADE, MAS FALHA EM ACELERAR  
REGENERAÇÃO NERVOSA APÓS LESÃO DO NERVO  
CIÁTICO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Florianópolis, SC

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

C568t Cidral Filho, Francisco José  
Terapia por diodo emissor de luz promove  
antihipersensibilidade, mas falha em acelerar regeneração  
nervosa após lesão do nervo ciático em camundongos  
[dissertação] / Francisco José Cidral Filho ; orientador,  
Adair Roberto Soares Santos. - Florianópolis, SC, 2011.  
1 v.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Fisioterapia. 3. Diodos emissores de  
luz. 4. Dor. 5. Nervo ciático. 6. Camundongo como animal de  
laboratório. I. Santos, Adair Roberto Soares dos. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências. III. Título.

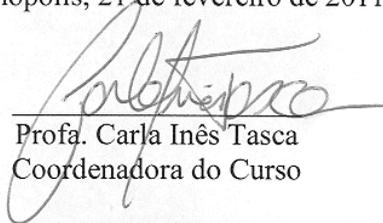
CDU 612.82

**FRANCISCO JOSÉ CIDRAL FILHO**

**“TERAPIA POR DIODO EMISSOR DE LUZ PROMOVE  
ANTIHIPERSENSIBILIDADE, MAS FALHA EM  
ACELERAR A REGENERAÇÃO NERVOSA APÓS  
LESÃO DO NERVO CIÁTICO EM CAMUNDONGOS”**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

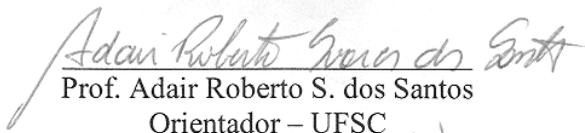
Florianópolis, 21 de fevereiro de 2011.



---

Prof. Carla Inês Tasca  
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:



---

Prof. Adair Roberto S. dos Santos  
Orientador – UFSC



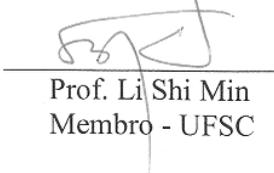
---

Prof. Eduardo Cargin Ferreira  
Membro da Banca Externo



---

Prof. Igor Dias Medeiros  
Membro da Banca Externo



---

Prof. Li Shi Min  
Membro - UFSC



Dedico este trabalho à minha esposa e  
companheira Regiane, por todo seu  
amor e incentivo.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador e amigo Adair pelo auxílio, orientação e incentivo. Agradeço a todos os meus amigos do laboratório de neurobiologia da dor e inflamação, em especial ao Ari, Daniel, Leidi, Marina e Morgana por terem me auxiliado na execução dos experimentos, pelas observações e revisão do texto. Aos professores e funcionários do Centro de Ciências Biológicas e do programa de Pós-graduação em Neurociências pela amizade e auxílio. À CAPES pelo apoio financeiro.



Il mondo è un bel libro, ma poco serve a chi non lo sa leggere.

Carlo Goldoni (1707 – 1793)



## RESUMO

Estudos recentes demonstraram que a terapia por diodo emissor de luz (LEDT, do inglês, *light-emitting diode therapy*) apresenta atividade antinociceptiva em modelos animais de nocicepção aguda, além de ser capaz de estimular o processo de regeneração do tendão calcâneo em ratos. No entanto, sua possível atividade na hipersensibilidade e regeneração em modelos crônicos de neuropatia após lesão nervosa ainda não foi investigada. Com este objetivo, camundongos foram submetidos ao modelo de esmagamento do nervo ciático (ENC). Após sete dias, a LEDT (950 nm, a 80 mW/cm<sup>2</sup>, 2,5 J, a cada 24 horas por 15 dias) foi aplicada no local da lesão (grupo local) ou na face medial do membro posterior direito (grupo distal) dos animais operados. Os resultados obtidos demonstram que a LEDT, em ambos os locais de irradiação, reduziu efetivamente a hipersensibilidade mecânica induzida pelo ENC em relação ao grupo controle. Por outro lado, apenas no grupo distal a LEDT foi capaz de inibir a hipersensibilidade ao frio induzida pelo ENC. Além disso, a LEDT, no grupo distal, diminuiu os níveis de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  na medula espinal e, no grupo local, diminuiu os níveis de TNF- $\alpha$  na medula espinal e nervo ciático dos animais submetidos ao ENC. Por fim, a LEDT não foi capaz de acelerar a recuperação da função motora, nem a regeneração nervosa dos animais. Em conjunto, estes dados fornecem, pela primeira vez, evidências que a LEDT promoveu anti-hipersensibilidade via diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tanto no nervo ciático como na medula espinal, mas não conseguiu acelerar a regeneração nervosa de camundongos submetidos à lesão por ENC.

**Palavras-chave:** terapia do diodo emissor de luz, dor neuropática, esmagamento do nervo ciático.



## ABSTRACT

Light-emitting diode therapy (LEDT) has been shown to present antinociceptive activity in animal models of acute nociception, as well as stimulate the repair process of the calcaneal tendon in rats. However, LEDT possible antihypersensitivity and regenerative effects in chronic models of neuropathy after nerve injury have not been investigated. To that purpose, mice were submitted to the sciatic nerve crush model (SNC). After seven days, LEDT (950 nm, 80 mW/cm<sup>2</sup>, 2.5 J, every 24 hrs for 15 days) was irradiated on the crush site (local group) or on the medial aspect of the right hind leg (distal group). The results obtained demonstrate that LEDT when irradiated on both local and distal sites effectively reduced mechanical hypersensitivity induced by the SNC injury in comparison to control group. On the other hand, only in distal group LEDT was able to inhibit cold hypersensitivity induced by SNC. Furthermore, LEDT, in distal group, decreased the levels of TNF- $\alpha$  and IL1- $\beta$  in the spinal cord; and in local group, decreased the level of TNF- $\alpha$  in the spinal cord and sciatic nerve after SNC. Lastly, chronic LEDT neither accelerate motor functional recovery, nor morphological nerve regeneration after SNC. Taken together these data provide, for the first time, evidence that LEDT promoted antihypersensitivity effect via decrease of pro-inflammatory cytokines levels, both in the sciatic nerve and the spinal cord, but failed to accelerate nerve regeneration of mice submitted to the SNC injury.

**Keywords:** Light-emitting diode therapy, neuropathic pain, sciatic nerve crush.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sistema Nervoso Periférico.....	28
Figura 2 – O nervo ciático e suas principais subdivisões.....	29
Figura 3 – Organização geral do nervo e seus compartimentos.....	30
Figura 4 – Regeneração walleriana após secção nervosa.....	33
Figura 5 – Modelos experimentais de dor neuropática.....	35
Figura 6 – Ativação microglial em NPs.....	38
Figura 7 – LED e Junção P-N.....	39
Figura 8 – Aspectos físicos da luz irradiada por LASERS e LEDS.....	40
Figura 9 – Profundidade de penetração x comprimento de onda ( $\lambda$ ).....	43
Figura 10 – Locais de irradiação da LEDT utilizadas neste estudo.....	53
Figura 11 – Esmagamento do nervo ciático em camundongos.....	55
Figura 12 – Avaliação da hipersensibilidade.....	57
Figura 13 – Índices funcional e estático do ciático.....	60
Figura 14 – Análise morfométrica do nervo ciático.....	63
Figura 15 – Avaliação da Hipersensibilidade mecânica: diferentes fluências.....	68
Figura 16 – Avaliação da hipersensibilidade mecânica no teste de von Frey.....	69
Figura 17 – Avaliação da força de prensão.....	70
Figura 18 – Avaliação da hipersensibilidade térmica ao frio.....	72
Figura 19 – Avaliação dos índices do nervo ciático.....	73
Figura 20 – Análise morfométrica do nervo ciático.....	75
Figura 21 – Avaliação da massa muscular.....	76
Figura 22 – Avaliação da atividade locomotora.....	77
Figura 23 – Avaliação das citocinas anti e pró-inflamatórias.....	78
Figura 24 – Lei de Arndt-Schultz.....	83



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Diferenças de irradiação LASER e de LEDs. ....	41
Tabela 2- Parâmetros de LEDT utilizados.....	52
Tabela 3- Resumo dos resultados obtidos neste estudo.....	80



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUC – Área sob a curva

cm – Centímetro

ELISA - Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*)

EPL – Comprimento da pegada da pata experimental (do inglês, *experimental print length*)

ENC – Esmagamento do nervo ciático

ETS – Distância entre os dedos da pata experimental (do inglês, *experimental toe spread*)

g - Grama

i.p. - Intraperitoneal

IEC – Índice estático do ciático

IFC – índice funcional do ciático

IL-10 – Interleucina 10

IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 beta

IM – Inibição máxima

J - Joule

Kg - Quilograma

PL – Comprimento da pegada (do inglês, *print length*)

PLF – Fator do comprimento da pegada (do inglês, *print length factor*)

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

LEDT – Terapia por diodo emissor de luz (do inglês, *light-emitting diode therapy*).

mg - Miligrama

min - Minuto

mW - Micro watt

nm – Nanômetro

NP – Neuropatia periférica

NPL – Comprimento da pegada da pata normal (do inglês, *normal print length factor*)

NS – Não significativo

NTS – Distância entre os dedos da pata normal (do inglês, *normal toe spread*)

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *Tumor necrosis factor alpha*)

TS – Distância entre os dedos da pata (do inglês, *toe spread*)

TSF – Fator da distância entre os dedos da pata (do inglês, *toe spread factor*)

TTO - Tratamento

$\mu\text{m}$  – Micrômetro

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\Phi$  – Potência radiante.

$a$  – Área do feixe luminoso.

$E_e$  – Densidade de potência ou irradiância.

$H$  – Densidade de energia.

$Q$  – Energia radiante.

$\lambda$  – Comprimento de onda.



# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
1.1 SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO .....	27
1.2 NEUROPATIAS PERIFÉRICAS .....	31
<b>1.2.1 Neuropatias envolvendo o nervo ciático</b> .....	<b>34</b>
<b>1.2.2 Modelos animais de neuropatia periférica</b> .....	<b>34</b>
1.3 DOR NEUROPÁTICA .....	36
1.4 TERAPIA POR DIODO EMISSOR DE LUZ .....	39
<b>1.4.1 Parâmetros para dosimetria</b> .....	<b>43</b>
1.4.1.1 Comprimento de onda ( $\lambda$ ) .....	44
1.4.1.2 Potência radiante phi ( $\Phi$ ) .....	44
1.4.1.3 Energia radiante (Q) .....	44
1.4.1.4 Área do feixe luminoso (a) .....	45
1.4.1.5 Densidade de potência ou irradiância (Ee) .....	45
1.4.1.6 Densidade de energia ou fluência (H) .....	45
1.5 MECANISMOS DE AÇÃO DA FOTOTERAPIA .....	46
1.6 JUSTIFICATIVA .....	47
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	49
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	49
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
3.1 ANIMAIS .....	51
3.2 TERAPIA POR DIODO EMISSOR DE LUZ .....	51
3.3 ESMAGAMENTO DO NERVO CIÁTICO .....	53
3.4 HIPERSENSIBILIDADE MECÂNICA .....	55
<b>3.4.1 Filamentos de von Frey</b> .....	<b>55</b>
<b>3.4.2 Força de Preensão</b> .....	<b>56</b>
3.5 HIPERSENSIBILIDADE AO FRIO .....	57
3.6 ÍNDICES DO NERVO CIÁTICO .....	58
3.7 HISTOLOGIA E ANÁLISE MORFOMÉTRICA .....	60
<b>3.7.1 Preparação das Amostras</b> .....	<b>60</b>
<b>3.7.2 Técnicas Histomorfológicas</b> .....	<b>61</b>
<b>3.7.3 Tratamento das Imagens</b> .....	<b>61</b>
<b>3.7.4 Morfometria</b> .....	<b>62</b>
3.8 MASSA MUSCULAR DO MEMBRO POSTERIOR .....	63
3.9 ATIVIDADE LOCOMOTORA .....	64
3.10 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS .....	64
3.11 DROGAS .....	65
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	65
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>67</b>
4.1 EFEITO DA LEDT NA HIPERSENSIBILIDADE MECÂNICA .....	67
4.2 EFEITO DA LEDT NA HIPERSENSIBILIDADE AO FRIO .....	70
4.3 EFEITO DA LEDT NA RECUPERAÇÃO FUNCIONAL .....	73

4.4 EFEITO DA LEDT NA REGENERAÇÃO NERVOSA .....	74
4.5 EFEITO DA LEDT NA PERDA DE MASSA MUSCULAR .....	75
4.6 EFEITO DA LEDT NA ATIVIDADE LOCOMOTORA .....	76
4.7 EFEITO DA LEDT NOS NÍVEIS DE CITOCINAS.....	77
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO

No ser humano, o sistema nervoso periférico (SNP) é composto pelo conjunto de todo o tecido nervoso localizado fora do sistema nervoso central (SNC), incluindo os receptores sensoriais, os nervos e gânglios associados, bem como os plexos nervosos. O SNP fornece uma via de comunicação para os impulsos entre o SNC e o restante do corpo (VAN DE GRAAFF, 2001).

Os nervos são classificados, de acordo com sua distribuição anatômica, em cranianos ou espinais (Figura 1). Há doze pares de nervos cranianos que emergem da base do crânio e passam através de forames indo inervar estruturas na cabeça, pescoço e órgãos do tronco. Por outro lado, cada um dos 31 pares de nervos espinais está ligado à medula espinal por meio de raízes posteriores e anteriores. A raiz posterior contém os processos de neurônios sensoriais que transportam informações ao SNC, com corpos celulares agrupados em gânglios espinais na extremidade distal da raiz posterior. A raiz anterior, por sua vez, contém fibras nervosas motoras, que transmitem sinais do SNC para o restante do organismo, com corpos celulares localizados na região anterior da medula espinal. Os 31 pares de nervos espinais (Figura 1) são agrupados da seguinte forma: 8 cervicais, 12 torácicos, 5 lombares, 5 sacrais e 1 coccígeo (DRAKE; MITCHELL, 2004).

Um nervo espinal se divide em ramos imediatamente após emergir através do forame intervertebral: (1) ramo das meninges que inerva as meninges, as vértebras e ligamentos vertebrais; (2) ramo posterior, que inerva os músculos, articulações e pele das costas ao longo da coluna vertebral; (3) ramo anterior, que inerva os músculos e a pele nos aspectos lateral e anterior do tronco. É importante mencionar que combinações de ramos anteriores inervam os membros (VAN DE GRAAFF, 2001). Salvo no caso dos nervos torácicos T2 a T12, os ramos anteriores dos nervos espinais se combinam e depois se dividem em redes de fibras nervosas denominadas plexos nervosos. Há quatro plexos de nervos espinais: cervical, braquial, lombar e sacral (VAN DE GRAAFF, 2001).

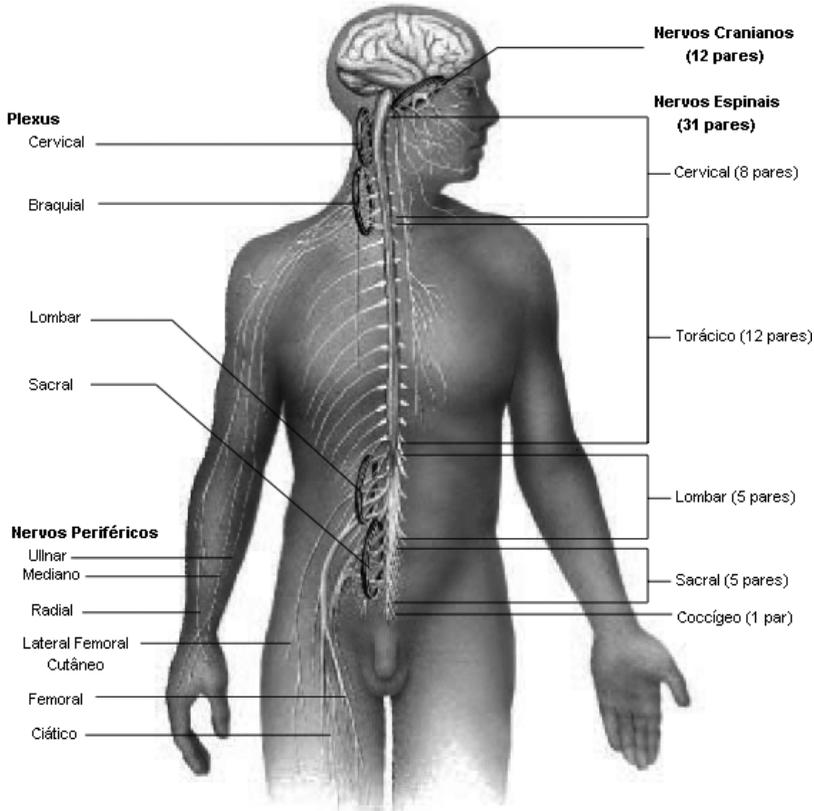


Figura 1 – Sistema Nervoso Periférico.

O sistema nervoso periférico compreende os nervos cranianos, espinhais, e os nervos que surgem a partir deles. Plexos e gânglios (não mostrados) também fazem parte do sistema nervoso periférico.

Fonte: Van De Graaff (2001).

De interesse para este estudo é o nervo ciático ou isquiático (Nomina Anatômica) (Figura 2)<sup>1</sup>. O nervo ciático emerge do plexo sacral, passa pela região glútea, e, em seguida, entra no compartimento posterior da coxa onde se divide em seus dois grandes ramos, o nervo fibular comum e o nervo tibial. O nervo ciático inerva todos os músculos do compartimento posterior da coxa, da perna e do pé (DRAKE; MITCHELL, 2004).

<sup>1</sup> Neste trabalho se optou pela denominação usual, i.e., nervo ciático.

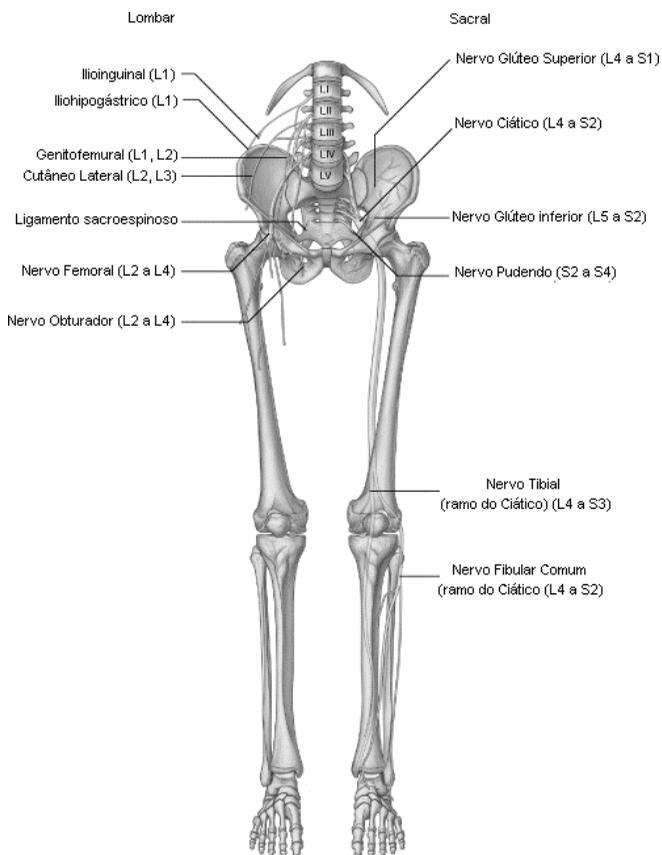


Figura 2 – O nervo ciático e suas principais subdivisões.

Fonte: Adaptado de Drake e Mitchell (2004).

Cada nervo é constituído de tecido conjuntivo e componente neural. As estruturas de tecido conjuntivo dos nervos formam três camadas distintas: endoneuro, perineuro e epineuro, do interior para a exterior, respectivamente. Essas estruturas organizam e protegem as fibras nervosas (KAPLAN et al., 2009) (Figura 3).

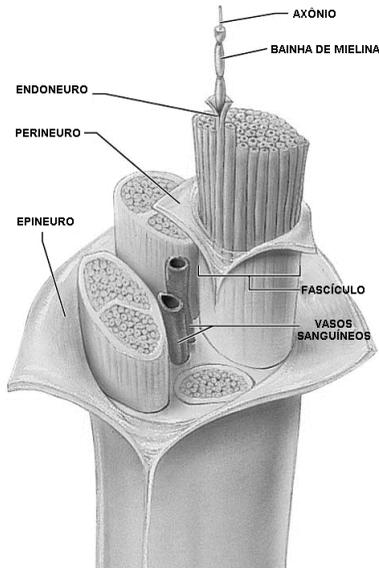


Figura 3 – Organização geral do nervo e seus compartimentos.  
 Fonte: Adaptado de Marieb e Hoehn (2006).

O epineuro é a camada mais externa de tecido conjuntivo que envolve todo o nervo. Esta camada inclui um plexo de vasos sanguíneos e linfáticos, alguns macrófagos residentes, fibroblastos e mastócitos. Sua espessura pode ser bastante variável e, às vezes, incluir tecido adiposo (GEUNA et al., 2009). O perineuro é a bainha de tecido conjuntivo que envolve as fibras nervosas, e é constituído por camadas celulares dispostas concêntricamente (KAPLAN et al., 2009). Finalmente, o endoneuro é composto de feixes de fibras colágenas dispostas longitudinalmente, esta é a camada mais interna que envolve as células de Schwann com as fibras nervosas em seu interior (KAPLAN et al., 2009). O endoneuro contém ainda mastócitos, macrófagos residentes, alguns fibroblastos e vasos sanguíneos (ZOCHODNE, 2008).

Os componentes neurais do nervo do SNP são as fibras nervosas, em geral, um axônio com célula de Schwann e bainha de mielina. Os axônios são mielinizados em segmentos (internodos) separados por nodos de Ranvier. Uma única célula de Schwann supre a bainha de mielina de cada internodo. Um nervo consiste em numerosas fibras agrupadas em fascículos por bainhas de tecido conjuntivo. As fibras nervosas mielinizadas e não-mielinizadas estão entremeadas dentro do fascículo (DRAKE; MITCHELL, 2004).

Em relação à sua função, um nervo pode ser motor, sensorial ou motor-sensorial (misto). Existem três tipos de fibras nervosas em um nervo misto que incluem: fibras nervosas sensoriais (aférentes), motoras (fibras eférentes) e autonômicas (fibras autonômicas). As fibras podem ainda ser classificadas com base em seu diâmetro em tipo A, B ou C. Fibras A possuem diâmetros, mielinização e velocidade de condução graduada, sendo subdivididas em quatro tipos: A $\alpha$ , A $\beta$ , A $\gamma$  e A $\delta$ . Fibras do grupo B são mielinizadas com diâmetro pequeno e estão presentes no sistema nervoso autônomo (SNA). Por fim, As fibras do grupo C apresentam pequeno diâmetro e baixa velocidade de condução (KIERNAN, 2009). É importante ressaltar que grandes axônios mielinizados aférentes (A $\beta$ ) estão associados com mecanorreceptores de baixo limiar; enquanto que axônios pouco mielinizados (A $\delta$ ) e não-mielinizados (C) contêm receptores de alto limiar que transmitem estímulos dolorosos (nociceptores) (KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009)

## 1.2 NEUROPATIAS PERIFÉRICAS

A neuropatia periférica (NP) é uma doença neuromuscular comum, geralmente desencadeada por trauma ou lesão ou ainda por alguma condição patológica que adversamente afeta os nervos, causando deficiências sensório-motoras e incapacidades funcionais (VALLAT; MAGY, 2005). NPs estão entre os problemas neurológicos mais comuns, entretanto poucas terapias e intervenções estão disponíveis para impedir ou reverter os danos associados (ZOCHODNE, 2008).

As NPs mais comuns são aquelas que afetam primariamente o axônio, chamadas de axonopatias. Estas são frequentemente causadas por traumas agudos, podendo ocorrer esmagamento por compressão, por contusões traumáticas, ou secção por artefatos penetrantes (PARKER, 2002). NPs podem ser ainda resultantes de doenças sistêmicas, tais como diabetes, uremia, AIDS ou deficiências nutricionais e doenças vasculares ou do tecido colágeno, tais como aterosclerose, lúpus eritematoso sistêmico, esclerodermia, sarcoidose, artrite reumatóide, e poliartrite nodosa (PARKER, 2002).

Estima-se que a prevalência das NPs seja de aproximadamente 2.400 a cada 100.000 pessoas (2,4 % da população mundial), e que entre as pessoas com mais de 55 anos esta prevalência alcance 8% (ENGLAND; ASBURY, 2004).

Existe um consenso generalizado sobre a classificação das lesões nervosas em três classes (ou tipos, ou graus). Lesões leves afetam a bainha de mielina, lesões mais graves afetam o axônio, e as mais severas, o tecido conjuntivo (PARKER, 2002)

As lesões do tipo 1 são denominadas de neuropraxias. São lesões decorrentes de compressão que levam a isquemia transitória ou desmielinização paranodal. Isquemia resulta em perda funcional transitória reversível associada ao bloqueio temporário dos impulsos nervosos. A desmielinização paranodal, por sua vez, decorre de compressão mais grave e é uma lesão estrutural leve. A disfunção persiste até a remielinização paranodal, que geralmente ocorre após algumas semanas (MCMAHON, 2006). Este tipo de lesão é comumente associada à compressão focal moderada do nervo (por exemplo, *Saturday night palsy*) e apresenta bom prognóstico e recuperação rápida devido à preservação da continuidade axonal (PARKER, 2002).

As lesões do tipo 2 ou axonotmeses, são desencadeadas por esmagamento que interrompem a continuidade axonal, entretanto as células neurilemais da lâmina basal permanecem intactas. Nesta lesão ocorre a degeneração walleriana distal ao local da lesão (descrita abaixo - Figura 4). Esta lesão comumente acarreta importante déficit sensorial, simpático e motor. Não obstante, o prognóstico é bom, mas de recuperação lenta (geralmente meses) (PARKER, 2002).

Por fim, nas lesões do tipo 3 ou neurotmeses, o axônio é seccionado e o tecido conjuntivo interrompido com rompimento total do nervo. A degeneração walleriana é inevitável e a regeneração axonal é severamente limitada, além disso, a formação de neuromas e regeneração aberrantes são comuns. Desta forma, o prognóstico é ruim devido rompimento do tecido conjuntivo e formação de cicatrizes que podem interferir na regeneração axonal, sendo que correção cirúrgica com ou sem autotransplante é muitas vezes necessária (PARKER, 2002).

Degeneração walleriana é um processo que ocorre quando uma fibra nervosa é esmagada ou seccionada, no qual a parte do axônio separada do corpo celular degenera distalmente à lesão (COLEMAN et al., 1998), com infiltração de macrófagos que removem a mielina e os restos axonais. Durante este processo, a membrana basal que envolve o axônio e células de Schwann permanecem intactas formando um tubo. Dentro de 96 horas da lesão, a extremidade proximal da fibra nervosa envia brotamentos em direção ao tubo atraídos por fatores de crescimento produzidos pelas células de Schwann. Se um brotamento alcança o tubo, ele avança cerca de 1 mm por dia em seu interior,

eventualmente reinervando o tecido alvo. Se os brotos não alcançam o tubo, por exemplo, porque a distância é muito grande ou devido à formação de tecido cicatricial, intervenção cirúrgica é necessária (MCMAHON, 2006). Importante observar que a degeneração walleriana em nervos distais pode contribuir para o desenvolvimento da hipersensibilidade na dor neuropática. Quando um nervo é seccionado ou esmagado, as fibras nervosas distais ao corte sofrem degeneração walleriana e as fibras adjacentes não lesionadas são expostas a um ambiente endoneural alterado com a presença de diversas substâncias tais como quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento, o que pode levar ao desenvolvimento de sensibilização periférica ou central (MCMAHON, 2006).

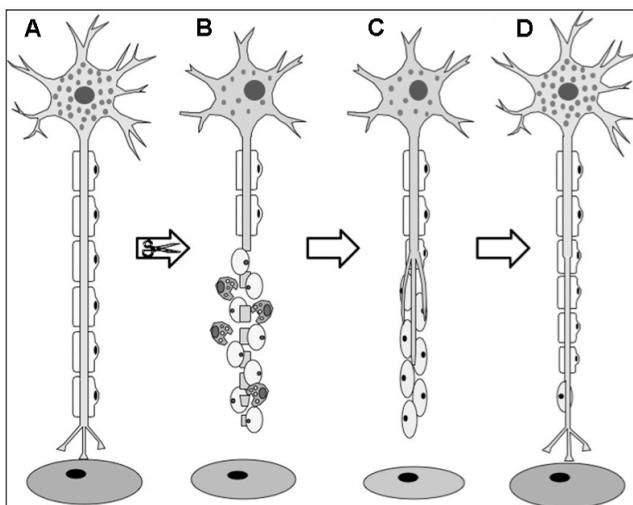


Figura 4 – Regeneração walleriana após secção nervosa.

(A) fibra nervosa normal; (B) lesão por transecção das fibras e fase inicial da degeneração Walleriana; (C) Células de Schwann direcionam o crescimento axonal; (D) Regeneração axonal.

Fonte: Adaptado de Navarro et al. (2006).

### **1.2.1 Neuropatias envolvendo o nervo ciático**

A maioria das neuropatias envolvendo o nervo ciático são traumáticas, seja por compressão externa, lesão localizada, injeções mal direcionadas, ou fratura, luxação ou artroplastia do quadril. Outras etiologias incluem hematomas, fibroses, endometriose (dor ciática catamenial), tumores (neurofibroma, schwannoma, linfoma), aneurisma, pseudo-aneurismas, síndrome compartimental e neuropatia isquêmica. A compressão do nervo ciático proximal pelo músculo piriforme (síndrome do piriforme ou ciática extraspinal) é controversa e com frequência incerta (BARON, 2009).

Os sintomas incluem dor na coxa e glúteos, acentuada por movimento de flexão do quadril, adução e rotação interna. Em casos mais graves ocorre debilidade dos músculos isquiotibiais bem como de todos os músculos abaixo do joelho com perda sensorial que envolve todo o pé e panturrilha. Dor e características da síndrome de dor complexa regional, podem estar presentes (PARKER, 2002).

O tratamento depende da etiologia e gravidade da lesão. A maioria das lesões parciais resultantes da artroplastia de quadril ou injeções mal-localizadas são tratadas de forma conservadora. O prognóstico é delicado em lesões graves com perda axonal (PARKER, 2002).

### **1.2.2 Modelos animais de neuropatia periférica**

Atualmente, os modelos animais de NP cobrem diversas etiologias e estão relacionadas a um quadro extenso de manifestações clínicas de NPs (SORKIN; YAKSH, 2009). A lesão pode ser induzida por injúria mecânica (secção; esmagamento ou compressão), química, metabólica ou imunológica dirigida ao nervo, gânglio ou medula espinal. O modelo do ENC utilizado neste estudo é decorrente de uma lesão física (por esmagamento) dirigida ao nervo. A figura 5 demonstra as lesões especificamente geradas por trauma físico do nervo periférico (KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009).

O ENC se presta tanto para a avaliação da regeneração nervosa, quanto da hipersensibilidade mecânica e térmica que se desenvolvem após a lesão. Por ser um modelo de axoniotmese, a estrutura do nervo é preservada, ao menos em parte, facilitando a regeneração, bem como a

avaliação da hipersensibilidade mecânica e térmica, considerados como sinais representativos de dor neuropática em estudos translacionais (KONTINEN; MEERT, 2003).

Finalmente, este modelo é de fácil execução e alta reprodutibilidade (BRIDGE et al., 1994). Por não haver necessidade de sutura, dispensa o conhecimento de técnicas microcirúrgicas e instrumental e material de alto custo (BOCCABELLA et al., 1964; NICHOLLS; ROSSITER, 1964; DE MEDINACELI et al., 1994).

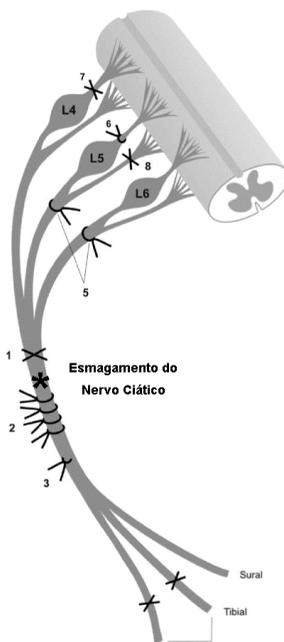


Figura 5 – Modelos experimentais de dor neuropática.

Ilustração esquemática dos modelos experimentais de dor neuropática, com base em danos às estruturas nervosas periféricas: \* Esmagamento do nervo ciático (BOCCABELLA, 1964). (1) Transecção do nervo ciático (WALL et al., 1979). (2) Lesão por constrição crônica (BENNET; XIE, 1988). (3) Ligadura parcial do nervo ciático (SELTZER et al., 1990). (4) Modelo de lesão do nervo poupada (DECOSTERD; WOOLF, 2000). (5) Ligadura dos nervos espinais L5/L6 (KIM; CHUNG, 1992). (6) Constrição da raiz dorsal (TABO et al., 1999). (7) Rizotomia dorsal (LOMBARD et al., 1979). (8) Rizotomia Ventral (LI et al., 2002).

Fonte: Adaptado de Klusakova e Dubovy (2009).

### 1.3 DOR NEUROPÁTICA

A grande maioria das NPs é acompanhada pelo desenvolvimento de dor neuropática, que de acordo com a IASP (*International Association for the Study of Pain*) é desencadeada como consequência direta de lesão ou doença afetando o sistema somatosensorial (LOESER; TREEDE, 2008).

A dor de origem neuropática é relativamente comum, com incidência estimada na população mundial, em torno de 1 a 3% (DWORKIN et al., 2003; IRVING, 2005), principalmente pelo fato de acompanhar uma grande gama de patologias e disfunções, como diabetes, herpes-zóster, lesão medular, acidente vascular encefálico, esclerose múltipla, câncer, infecção por HIV, bem como as radiculopatias cervical ou lombar, além de poder ser desencadeada por lesões nervosas traumáticas ou pós-cirúrgicas (BOUHASSIRA et al., 2008).

A principal sintomatologia clínica das neuropatias periféricas inclui dor espontânea ou hipersensibilidade da área afetada, levando à hiperalgesia ou alodínia (FINNERUP; JENSEN, 2004), que ocorrem principalmente devido às alterações ocorridas na medula espinal (CODERRE et al., 1993; WOOLF, 2000; WOOLF, 2004).

A dor neuropática é geralmente crônica e incapacitante, e em boa parte resistente aos tratamentos farmacológicos, estando entre as mais difíceis de tratar (DWORKIN et al., 2003; FINNERUP et al., 2005; ATTAL et al., 2010). Pacientes com dor neuropática freqüentemente não respondem bem a antiinflamatórios não-esteroidais e são muitas vezes resistentes ou insensíveis aos opióides. Atualmente o tratamento é realizado com a utilização de antidepressivos tricíclicos, inibidores da recaptação de serotonina, anticonvulsivantes e capsaicina de uso tópico (creme ou pomada), dentre outros. Entretanto, estes fármacos apresentam limitada eficácia e/ou significativos efeitos adversos que comprometem sua utilização (BARON, 2009).

A lesão ao longo de uma via nociceptiva, como a induzida pelo esmagamento do nervo ciático, pode afetar não apenas os nervos periféricos mas também vários níveis do sistema nervoso central (SNC) ocasionando dor neuropática, caracterizada, em modelos animais, pelo desenvolvimento de hipersensibilidade a estímulos mecânicos e térmicos (KONTINEN; MEERT, 2003).

Saade e Jabbur (2008), com base em evidências acumuladas durante as últimas duas décadas, descreveram a seqüência de eventos

que podem ocorrer no nervo após a indução da lesão: (1) produção imediata de disparos nervosos ocasionados pela lesão, que podem continuar por um longo período de tempo; (2) liberação de neuropeptídeos e mediadores pró-inflamatórios no local da lesão bem como no SNC; (3) sensibilização de nociceptores e ativação de nociceptores silenciosos através da liberação de mediadores inflamatórios ou expressão de novos receptores ou canais iônicos; (4) mudanças na expressão gênica e na expressão de diversos peptídeos e receptores; (5) crescimento anormal de fibras periféricas e centrais; (6) mudanças nos campos receptivos e modalidades sensoriais de fibras periféricas lesionadas e intactas;

Com relação ao efeito de lesões periféricas na medula espinal, Saade e Jabbur (2008), relatam que ocorrem mudanças nos campos receptivos das áreas periféricas no corno dorsal, acompanhados de diminuição da inibição pré-sináptica, fatos estes que sugerem mudanças importantes no processamento das informações sensoriais no corno dorsal. Além disso, segundo os mesmos autores (SAADE; JABBUR, 2008), a lesão de nervos sensoriais pode desencadear uma cascata de eventos no segmento correspondente da coluna vertebral ou núcleo do trigêmeo, que começa instantaneamente e perdura por períodos de tempo variáveis, dependendo do tipo, extensão e reversibilidade do dano resultante. Ocorrem ainda mudanças importantes na expressão fenotípica e síntese de neurotransmissores e neuropeptídeos, como por exemplo, uma redução na liberação de GABA e receptores GABAérgicos; mudanças na localização e/ou expressão de receptores para a substância P, para bradicinina, para opióides, para serotonina e ainda de transportadores de glutamato. Assim, o aparecimento de dor espontânea, disestesia e hiperalgesia tem sido correlacionado ao aumento da atividade espontânea e sensibilização dos neurônios do corno dorsal observado após trauma ou lesão dos tecidos periféricos e nervos (KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009). As possíveis moléculas sinalizadoras da lesão do nervo, responsáveis pela ativação microglial na porção do corno da raiz dorsal que recebe aferências diretas do nervo lesionado são a *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP -1 ou CCL2) e a *metalloproteinase-9* (MMP-9) uma vez que ambas apresentam expressão significativamente aumentada no gânglio da raiz dorsal de neurônios após lesão do nervo (microglia e dor neuropática) (SAADE; JABBUR, 2008).

Além disso, estudos indicam que a dor neuropática periférica é induzida não apenas pelo dano físico direto aos neurônios aferentes e seus ramos axonais, mas também indiretamente por moléculas

sintetizadas por células gliais e imunes durante a degeneração walleriana distal à lesão do nervo, tais como, citocinas (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10), quimiocina MCP-1, bem como fatores neurotróficos, BDNF, GDNF, NGF e NT-3 (Figura 6) (KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009). Estas moléculas parecem estar envolvidas na iniciação de estados de dor neuropática. Além disso, citocinas e quimiocinas são capazes de influenciar diretamente a excitação dos neurônios aferentes e seus axônios (XIAO et al., 2002; SORKIN; YAKSH, 2009).

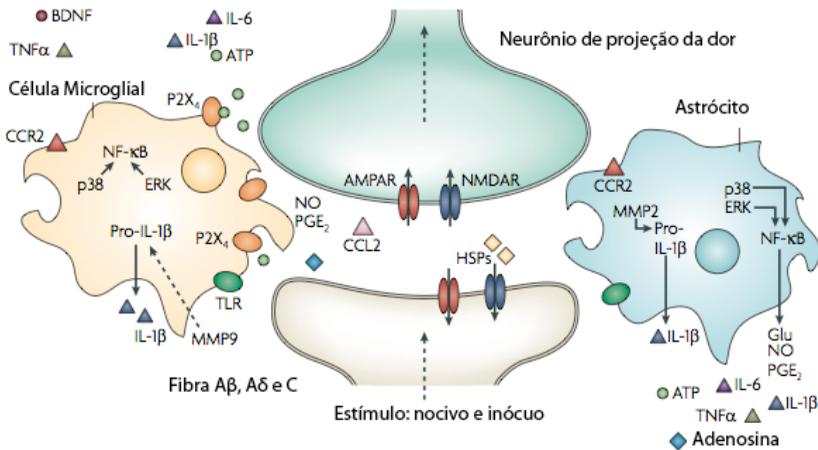


Figura 6 – Ativação microglial em NPs.

Na presença de uma entrada nociva constante, como no caso de inflamação crônica ou dano do nervo, sensibilização central sustentada leva a alterações transcricionais em neurônios do corno dorsal que alteram suas funções por períodos prolongados. Os astrócitos respondem a esta atividade sináptica contínua através da mobilização interna de Ca<sup>2+</sup>, levando à liberação de glutamato (Glu), ATP, que se liga ao P2X<sub>4</sub>, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6, óxido nítrico (NO) e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). A microglia ativada é também uma fonte de todos esses fatores pró-inflamatórios. Matriz metaloproteínase 9 (MMP9) induz a clivagem de pró-IL-1 $\beta$  e ativação da microglia, enquanto MMP2 induz a clivagem pró-IL-1 $\beta$  e mantém a ativação de astrócitos. A ativação da p38 proteína quinase ativada por mitógeno (p38 MAPK) é induzida em ambos microglia e astrócitos na sinalização da IL-1 $\beta$ . Astrócitos e microglia expressam os receptores de quimiocina CX3CR1 (não mostrado) e CCR2 e tornam-se ativados após a ligação com as respectivas quimiocinas. Após a lesão do nervo, proteínas de choque térmico (HSPs) são liberados e podem se ligar aos receptores Toll-like (TLRs), expressos em ambos astrócitos e microglia, levando a uma maior ativação desses tipos celulares. Fonte: Adaptado de Watkins et al. (2001).

## 1.4 TERAPIA POR DIODO EMISSOR DE LUZ

A terapia por diodo emissor de luz (Light-emitting diode therapy – LEDT) é uma forma de fototerapia, que utiliza como fonte de irradiação LEDs (VINCK et al., 2005). LEDs são diodos semicondutores (junção P-N) que quando energizados emitem luz (SCHUBERT, 2006) (Figura 7).

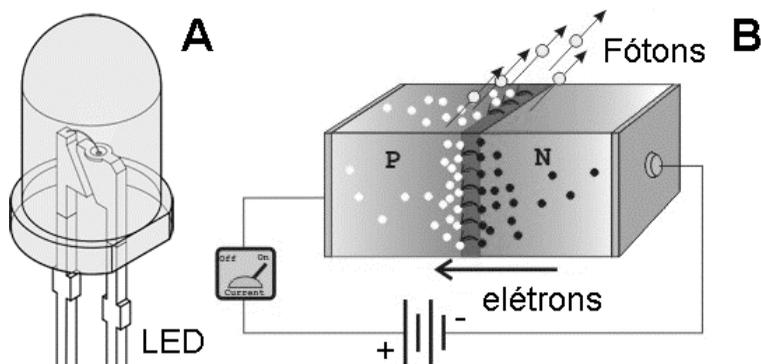


Figura 7 – LED e Junção P-N.

(A) LED; (B) Junção P-N: caracterizada pela junção de um semicondutor do tipo P (com cargas elétricas positivas) e de um semicondutor tipo N (com cargas elétricas negativas). A aplicação de tensão suficiente induz recombinações entre lacunas (P) e elétrons (N). Em cada recombinação um quantum de energia eletromagnética é liberado sob a forma de um fóton de luz.

Fonte: Adaptado de Schubert (2006).

Os termos "Fototerapia" e "Terapia Fotônica" aqui empregados dizem respeito às intervenções terapêuticas não invasivas com luz, como por exemplo, situações envolvendo a irradiação do tecido cutâneo e subcutâneo para a reparação tecidual, a acupuntura à base de luz e irradiação transcutânea para alívio da dor (ENWEMEKA, 2005).

Não obstante a moderna nomenclatura, o emprego terapêutico da luz é bastante antigo, datando dos primórdios da humanidade. Os primeiros relatos são egípcios, de aproximadamente 1400 aC, e descrevem o tratamento de doenças de pele pela exposição à luz solar. Ao longo dos séculos, a irradiação solar tem sido utilizada no tratamento de diversas afecções em diferentes países, como China, Grécia e Roma

(BAROLET, 2008). Relatos similares continuaram através dos séculos, entretanto de forma esparsa e desorganizada. No início do século XX, pode-se destacar o trabalho de Nils Finsen, que em 1901 publicou os resultados do tratamento de *lupus vulgaris* com doses concentradas de radiação UV, trabalho este que lhe rendeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1903 (ROELANDTS, 2002). Anos mais tarde, na década de 1960, Endre Mester conduziu uma série de experiências sobre o potencial cancerígeno do LASER (do inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*; Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação) de baixa potência em camundongos. Seus resultados demonstraram que o LASER além de não induzir tumor, estimulou o crescimento do pêlo dos animais (MESTER et al., 1968). Esta foi a primeira demonstração de efeito biológico da fototerapia com fonte de LASER de baixa intensidade, fato que estimulou este cientista húngaro a realizar outros estudos que culminaram na confirmação da eficácia da luz vermelha na cicatrização de ferimentos (BAROLET, 2008).

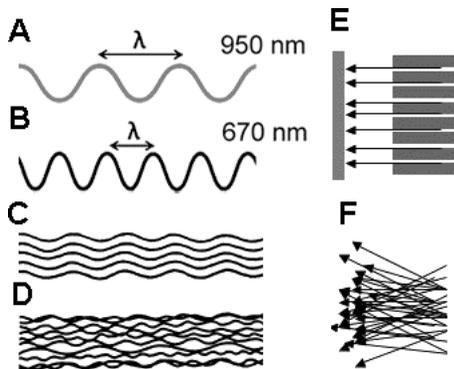


Figura 8 – Aspectos físicos da luz irradiada por LASERS e LEDs.

(A-B) Diferentes comprimentos de onda: Comprimento de onda é a distância entre dois picos de onda. (C) Irradiação coerente: Na irradiação coerente as ondas dos fótons que compõe o feixe de luz estão em fase, ocorre com a irradiação LASER. (D) Irradiação incoerente: na irradiação incoerente as ondas dos fótons que compõe o feixe de luz não se encontram em fase, característica da irradiação LED. (E) Irradiação colimada: Irradiação que se propaga com feixe de ondas praticamente paralelas, ocorre com a irradiação LASER. (F) Irradiação divergente: Irradiação que se propaga com feixe de ondas desalinhadas, característica da irradiação LED.

FONTE: Adaptado de Baxter (2003).

Primeiramente, os efeitos biológicos da fototerapia foram explicados pela propriedade de coerência (Figura 8 e Tabela 1) da luz emitida por LASERS (MESTER et al., 1985). Entretanto, novos estudos indicaram que a coerência não desempenha um papel essencial na interação Luz-tecido, em primeiro lugar, foi demonstrado que tanto a luz coerente como a não-coerente apresentam a mesma eficácia (LOBKO et al., 1985; PONTINEN et al., 1996) e que além disso, a coerência é perdida assim que atravessa as primeiras camadas da pele (LOBKO et al., 1985; BASFORD, 1995; NUSSBAUM; BAXTER, 2003). Estas pesquisas impulsionaram a expansão da fototerapia com fontes emissoras de luz não coerentes como os diodos emissores de luz – LEDs (LOBKO et al., 1985; PONTINEN et al., 1996; VINCK et al., 2003). Outras diferenças importantes entre os aparelhos de LASER e LED estão descritas na tabela 1. (SCHUBERT, 2006).

**Tabela 1- Diferenças de irradiação LASER e de LEDs.**

LED	LASER
<i>Light-emitting diode</i> - diodo emissor de luz.	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> ; Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação.
Pequenos no tamanho, possuem longa vida útil, são confiáveis e requerem pouca energia.	São maiores em tamanho, com vida mais longa, são menos confiáveis e necessitam de mais energia.
Produzem feixe de luz incoerente <sup>a</sup> , divergente <sup>b</sup> com grande gama de comprimentos de onda <sup>c</sup> .	Produzem feixe de luz monocromática, coerente <sup>d</sup> e colimada <sup>e</sup> .
Aparelhos de LED podem ser feitos para produzir múltiplos comprimentos de onda, estimulando uma ampla gama de tecidos.	Aparelhos de LASER são em geral produzidos com um comprimento de onda.
Resposta rápida.	Resposta é ainda mais rápida.
Pequeno custo.	Alto custo.
Intensidade de geração de luz é menor.	Intensidade de geração de luz é maior.
As sondas dos aparelhos de LEDs podem cobrir uma área de tratamento mais extensa.	As sondas dos aparelhos de LASER cobrem uma pequena área de tratamento.

(a) Incoerente: As ondas dos fótons que compõe o feixe de luz não se encontram em fase. (b) Divergente: Irradiação que se propaga com feixe de ondas desalinhasadas. (c) Comprimento de onda: diz-se da distância entre dois picos de onda. (d) Coerente: As ondas dos fótons que compõe o feixe de luz estão em fase. (e) Colimada: Irradiação que se propaga com feixe de ondas praticamente paralelas.

A década de 90 foi marcada por importante impulso na pesquisa com LEDs dada pela *National Aeronautics and Space Administration*

(NASA), a qual constatou que a luz de LEDs em comprimentos de onda específicos acelera o crescimento das plantas bem como a cicatrização de tecidos (BAROLET, 2008). Esta investigação despertou o interesse da utilização da terapia por LED em uma variedade de condições que vão desde fins cosméticos, cicatrização de tecidos e tratamento de lesões de tecidos moles (VINCK et al., 2005) até o tratamento do câncer de pele (BAROLET, 2008).

Estudos indicam que as radiações vermelha e infravermelha penetram os tecidos biológicos com menor perda, atingindo estruturas mais profundas, fato que delimita uma importante “janela terapêutica”, entre cerca de 600 nm e 1200 nm (NIEMZ, 2007; BAROLET, 2008) (Figura 9). Em nível celular, a LEDT com comprimento de onda no espectro do vermelho e infravermelho (600–1200 nm) pode modular a proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno, promover angiogênese, estimular macrófagos e linfócitos por melhorar o metabolismo energético no interior da mitocôndria, além de promover a produção de fatores de crescimento (EELLS et al., 2004; DESMET et al., 2006). Além disso, sugere-se que a LEDT nesta faixa espectral (600–1200 nm) altera a expressão de genes envolvidos na cicatrização de tecidos e modulação da dor (EELLS et al., 2004), sendo potencialmente eficaz no tratamento da dor de diferentes etiologias, embora esta afirmação ainda não tenha sido substancialmente investigada (VINCK et al., 2003; VINCK et al., 2005; VINCK et al., 2006; SUSHKO et al., 2007).

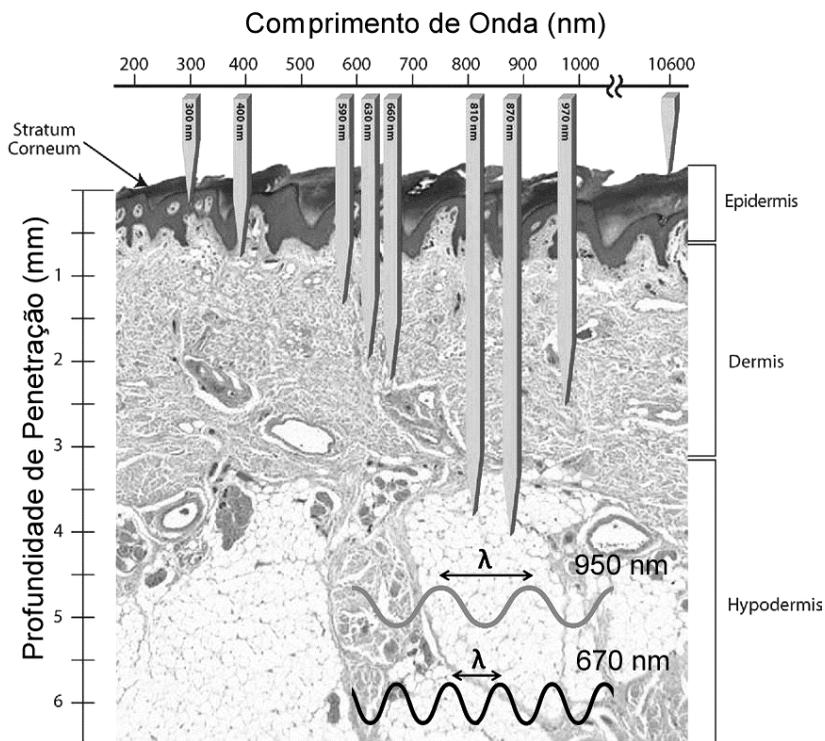


Figura 9 – Profundidade de penetração x comprimento de onda ( $\lambda$ ).

Estudos indicam que as radiações vermelha e infravermelha penetram os tecidos biológicos com menor perda, atingindo estruturas mais profundas, fato que delimita uma importante “janela terapêutica”, entre cerca de 600 nm e 1000 nm. Fonte: Adaptado de Barolet (2008).

### 1.4.1 Parâmetros para dosimetria

Em fototerapia o conhecimento dos vários parâmetros envolvidos na dosimetria são essenciais para determinar a quantidade correta de energia necessária para o tratamento (ENWEMEKA, 2009). Abaixo segue descrição dos seguintes parâmetros: (1) de comprimento de onda, (2) potência radiante, (3) energia radiante, (4) densidade de potência, (5) densidade de energia (6) área do feixe luminoso. Segue breve descrição destes parâmetros, segundo Enwemeka (2009).

#### 1.4.1.1 Comprimento de onda ( $\lambda$ )

O comprimento de onda da luz emitida pelo LED depende da distância entre os pólos da junção P-N, bem como dos materiais que a formam (SCHUBERT, 2006). Como ilustrado na Figura 8, a distância entre dois picos de onda é definida como um comprimento de onda. Quanto menor o comprimento de onda, maior a frequência de vibração da partícula de luz. Como regra geral, quanto maior o comprimento de onda de um dispositivo de fototerapia, maior a profundidade de penetração de seu feixe nos tecidos (ESNOUF et al., 2007; ENWEMEKA 2008; MEINHARD et al. 2008). Note que na figura 8, 950 nm (infravermelho) tem um maior comprimento de onda que a luz vermelha de 670 nm, o que implica em maior grau de penetração. Por esta razão comprimentos de onda mais longos, em geral infravermelhos, são geralmente recomendados para o tratamento de lesões mais profundas.

#### 1.4.1.2 Potência radiante phi ( $\Phi$ )

Potência radiante pode ser definida como a taxa na qual a energia é gasta. Geralmente é medida em watts (W), mas em fototerapia, uma vez que a quantidade de energia necessária para se obter benefícios terapêuticos é relativamente baixa, muitas vezes a potência radiante é medida em miliwatts (mW). Um milliwatt é um milésimo de watt. Por definição, potência pode ser determinada matematicamente pelo cálculo de energia por unidade de tempo, ou seja, dividindo a energia medida em joules (J) pelo tempo medido em segundos (s):

$$\text{Potência (W)} = \text{Energia (J)} / \text{Tempo (s)}$$

#### 1.4.1.3 Energia radiante (Q)

A energia radiante é uma medida da energia da radiação eletromagnética e é expressa em joules (J). A energia radiante é

calculada multiplicando-se a potência radiante pelo tempo, como mostra a seguinte relação matemática:

$$\text{Energia (J)} = \text{Potência (W)} \times \text{Tempo (s)}$$

#### 1.4.1.4 Área do feixe luminoso (a)

A área do feixe luminoso define a área coberta pelo feixe quer na ponta do aplicador ou a qualquer distância dada além desse ponto. Na ponta do aplicador, a área do feixe luminoso é essencialmente o mesmo que a área efetiva de radiação, portanto, pode ser facilmente assumido que ambos são intercambiáveis, quando o aplicador é colocado em contato direto com a pele do paciente.

#### 1.4.1.5 Densidade de potência ou irradiância ( $E_e$ )

A densidade de potência ou irradiância pode ser definida como a razão da potência sobre a área da superfície irradiada. A irradiância é basicamente a energia emitida pelo feixe de luz por unidade de área. A densidade de potência é medida em watts por centímetro quadrado ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ) e é calculada:

$$\text{Densidade de potência (W/cm}^2\text{)} = \text{Potência (W)} / \text{Área (cm}^2\text{)}$$

#### 1.4.1.6 Densidade de energia ou fluência (H)

Densidade de energia, também conhecida como fluência, pode ser definida como a quantidade de energia fornecida por unidade de área sendo geralmente expressa como a dose na prática. Em outras palavras, é a energia dividida pela área, medida em joules por centímetro quadrado e representada por H. Como energia ( $\text{J} = \text{W} \times \text{tempo}$ ) e densidade de energia = energia / área (a), segue-se que:

$$\text{Densidade de energia (H)} = \text{Potência (W)} \times \text{tempo (t)} / \text{Área (a)}$$

## 1.5 MECANISMOS DE AÇÃO DA FOTOTERAPIA

Segundo Baxter (2003) e Low (2001), ao ser irradiado sobre a pele, o feixe luminoso sofre dois processos: parte é refletido e parte penetra na mesma em proporções dependentes do comprimento de onda, da natureza da superfície tecidual e do ângulo de incidência. A parcela da radiação luminosa que não é refletida, por sua vez pode sofrer absorção ou espalhamento. O espalhamento compreende qualquer mudança na direção da propagação do feixe luminoso e depende do comprimento de onda do feixe incidente e das características do tecido receptor (TIPLER, 2000; BAXTER, 2003). A parcela restante da radiação luminosa é absorvida por moléculas fotoceptoras ou fotorreceptoras, capazes de serem excitadas pelos fótons incidentes, em decorrência de suas configurações eletrônicas ou atômicas. Dentre as moléculas capazes de reagir com os fótons estão os aminoácidos, os ácidos nucléicos e os cromóforos. Os aminoácidos e ácidos nucléicos apresentam absorção significativa no espectro ultravioleta (BAXTER, 1995). Os cromóforos, por sua vez, absorvem luz no espectro visível, sendo os mais comuns a hemoglobina e a melanina (BAXTER, 1995; NUSSBAUM; BAXTER, 2003), além de alguns componentes da cadeia respiratória, sobretudo a citocromo c-oxidase, que absorve tanto a radiação no espectro visível quanto no infravermelho (KARU, 1999).

Segundo Karu (1999), a interação entre a molécula fotoceptora e o feixe luminoso resulta na aceleração da transferência de elétrons na cadeia respiratória através de uma mudança nas propriedades de oxiredução dos transportadores. Uma fração da energia de excitação é convertida em calor, com incremento na temperatura local dos cromóforos. Tal incremento, por sua vez pode causar alterações estruturais nos fotorreceptores e, deste modo, desencadear alterações bioquímicas (LETOKHOV 1991).

Além disso, certas moléculas fotoceptoras, como as porfirinas e flavoproteínas, podem ser reversivelmente convertidas em estruturas fotosensibilizadas, com a geração de oxigênio molecular ( $O_2$ ), o qual pode exercer papel mediador nos efeitos biológicos da irradiação. Finalmente, ocorre a liberação de radicais livres, como o superóxido ( $O_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), frente à redução do oxigênio em água no final da cadeia respiratória. Embora a mitocôndria apresente um mecanismo de reabsorção de tais radicais, essas substâncias podem desencadear respostas secundárias múltiplas, uma vez que constituem

fonte de elétrons para a fosforilação do ADP (KARU, 1989; KARU, 1999).

Estes principais mecanismos que ocorrem durante a exposição à luz são seguidos por reações escuras (mecanismos secundários), que ocorrem quando a radiação efetiva é desligada. Assim, se inicia uma complexa cascata de sinalização celular ou transdução e amplificação do sinal fotônico, associada por exemplo, a mudanças na homeostase celular, alterações no ATP ou nos níveis de AMPc, modulação da síntese de DNA e RNA, alterações da permeabilidade da membrana, alcalinização do citoplasma e despolarização da membrana da célula (GRECO et al., 1989; KARU, 1989; VACCA et al, 1993; VACCA et al., 1994; KOLAROVA et al., 1999; REDDY, 2004).

A seqüência de eventos, finalmente, resulta em uma série de efeitos fisiológicos essenciais para a promoção do processo de cicatrização de feridas, para analgesia, ou outras respostas favoráveis, dentre as quais, aceleração de processos inflamatórios, re-absorção de edemas, regeneração de vasos linfáticos ou regeneração nervosa (GRECO et al., 1989; VACCA et al, 1993; VACCA et al., 1994; BAXTER, 1995; SKINNER et al., 1996).

Os mecanismos possíveis para a analgesia induzida pela LEDT são ainda menos compreendidos, uma vez que, provavelmente, nem todos os mecanismos de ação são identificados atualmente. No entanto, está bem estabelecido que a terapia fotônica influencia a síntese, liberação e metabolismo de inúmeras substâncias sinalizadoras envolvidas na analgesia, tais como endorfinas, óxido nítrico, prostaglandinas, bradicinina, acetilcolina e serotonina. Além desses efeitos neurofarmacológicos existem evidências experimentais da diminuição do processo inflamatório, diminuição da atividade das fibras C, aumento da circulação sanguínea e redução da excitabilidade do sistema nervoso (VACCA et al., 1994; REDDY, 2004; VINCK et al., 2006).

## 1.6 JUSTIFICATIVA

As neuropatia periféricas (NP) são doenças neuromusculares que afligem em torno de 2,4 % da população mundial (ENGLAND; ASBURY, 2004), entretanto, poucas terapias e intervenções estão disponíveis para impedir ou reverter os danos associados (ZOCHODNE, 2008). Além disso, as NPs são freqüentemente acompanhadas de dor

neuropática, geralmente crônica e incapacitante, e em boa parte resistente aos tratamentos farmacológicos disponíveis, estando entre as mais difíceis de tratar (DWORKIN et al., 2003; FINNERUP et al., 2005; ATTAL et al., 2010).

Estudos recentes demonstraram que a terapia por diodo emissor de luz (LEDT) apresenta atividade analgésica em casos de dor crônica (COSTA et al., 2008), bem como em modelos animais de nociceção aguda, como a estimulação elétrica da pata e o teste da formalina (LIMANSKY et al., 2006; TAMAROVA et al., 2009). Além disso, a LEDT foi capaz de estimular o processo de reparação do tendão calcâneo em ratos (BASTOS et al., 2009; CASALECHI et al., 2009). No entanto, sua possível eficácia na indução de anti-hipersensibilidade e na estimulação da regeneração nervosa e função motora após lesão nervosa não foi investigada.

Neste contexto, e no intuito de contribuir para o desenvolvimento de terapias não invasivas que possam complementar o tratamento das NPs e da dor neuropática associada, o presente estudo investigou o efeito da LEDT sobre as alterações comportamentais, bioquímicas e morfológicas, induzidas pela lesão nervosa periférica no modelo do esmagamento do nervo ciático em camundongos. Adicionalmente, a fim de contribuir para a compreensão dos mecanismos de ação da LEDT, avaliamos o papel das citocinas anti e pró-inflamatórias nesse efeito.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a possível eficácia da LEDT na redução da hipersensibilidade e na estimulação da regeneração nervosa e função motora após lesão por esmagamento do nervo ciático em camundongos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar, em camundongos submetidos ao ENC, o efeito da LEDT sobre:

- a hipersensibilidade mecânica com filamentos de von Frey e por meio da avaliação da força de preensão;
- a hipersensibilidade térmica no teste da placa fria;
- a atividade locomotora no teste do campo aberto;
- a recuperação da função motora através dos índices funcional e estático do nervo ciático (IFC e IEC);
- a regeneração nervosa através da análise de parâmetros morfométricos em cortes histológicos do nervo ciático;
- a perda de massa dos músculos sóleo e gastrocnêmio;
- os níveis das citocinas anti (IL-10) e pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) no nervo ciático e na medula espinal.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos com camundongos Swiss machos pesando entre 30 e 40g com 90 dias de idade no início dos experimentos.

Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas (06 às 18h) em temperatura de  $22\pm 2$  °C, com acesso à água e comida *ad libitum*. Todos os animais utilizados foram aclimatizados no laboratório pelo menos uma hora antes do início dos testes, realizados na fase clara do ciclo.

Os experimentos foram realizados após a aprovação do protocolo pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA), UFSC e foram realizados em conformidade com as diretrizes atuais para o cuidado dos animais de laboratório e as normas éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

O número de animais e a intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos.

#### 3.2 TERAPIA POR DIODO EMISSOR DE LUZ

Quatro grupos experimentais foram utilizados durante os experimentos (n = 8): controle (ENC - não tratado), sham (nervo ciático é exposto mas não esmagado), local (ENC - tratado) e distal (ENC - tratado). Durante a LEDT, os animais foram contidos em um tubo de plástico com cauda e os membros posteriores expostos. Os animais do grupo local foram tratados sobre a pele no local do esmagamento, enquanto os animais do grupo distal foram tratados distalmente ao local do esmagamento, no aspecto medial do membro posterior direito, com área de irradiação começando logo acima do maléolo medial (Figura 10). Durante o tratamento com LED o dispositivo foi mantido em leve contato com o local do tratamento. O dispositivo de LED utilizado nos experimentos foi um *MOLIMEDpen*® (*MDT Bioelectronics, Bettwiesen, Suíça*), com 950 nm, irradiância de 80 mW/cm<sup>2</sup> e fluência final de 2,5 J. Os parâmetros da LEDT utilizados estão detalhados na tabela 2.

A fim de determinar a fluência da LEDT utilizada no estudo, grupos adicionais de animais foram utilizados no primeiro experimento (Figura 15): Distal 1 J (13 segundos de irradiação) e Distal 4 J (50 segundos de irradiação). No mesmo experimento, para investigar se o estresse induzido pela contenção seria responsável pelo efeito da LEDT na hipersensibilidade, um grupo de animais ( $n = 8$ ) foi tratado com o dispositivo LED desligado (grupo off - os animais foram mantidos por 32 segundos com o dispositivo em leve contato com a face medial do membro posterior direita).

**Tabela 2- Parâmetros de LEDT utilizados**

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Comprimento de onda (nm)	950
Irradiação (mW/cm <sup>2</sup> )	80
Fluência (J/cm <sup>2</sup> )	2,5
Tempo de irradiação (segundos)	32
Área irradiada (cm <sup>2</sup> )	1
Número de tratamentos	15
Intervalo entre tratamentos (horas)	24

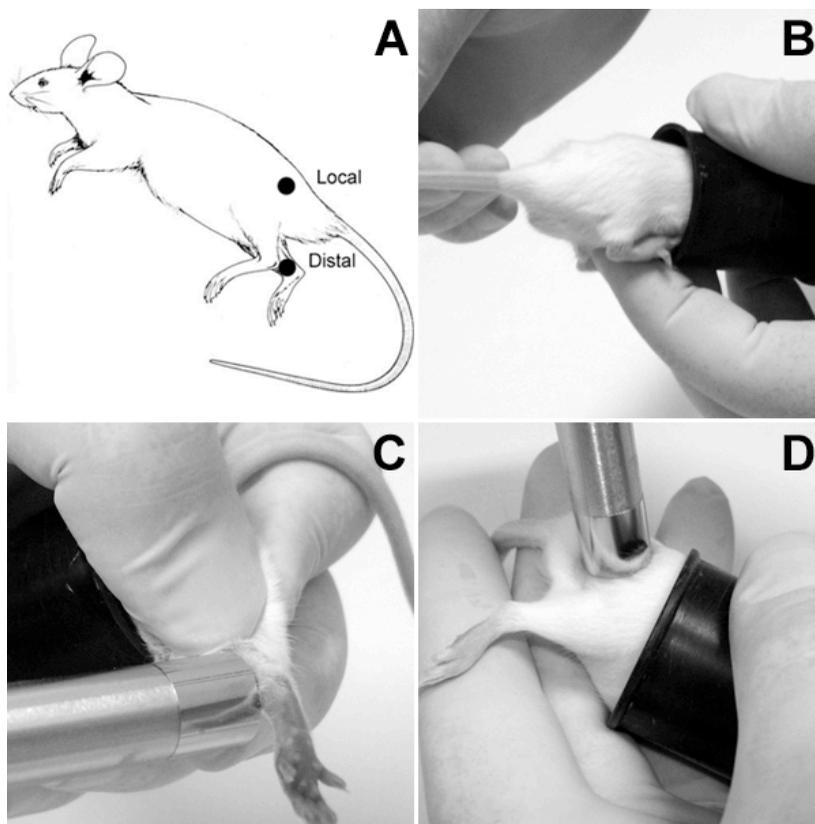


Figura 10 – Locais de irradiação da LEDT utilizadas neste estudo.

(A) Esquema dos locais de irradiação; (B) Camundongo dentro do tubo plástico de contenção; (C) Tratamento do grupo distal; (D) Tratamento do grupo local.

### 3.3 ESMAGAMENTO DO NERVO CIÁTICO

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados com os animais sob anestesia profunda induzida por uma solução de cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (20 mg/kg, i.p.). Após a verificação do estado de consciência do animal (através do pinçamento da cauda), foi efetuada tricotomia da área operada (coxa direita). Em seguida, foi feita uma incisão curvilínea na coxa direita do animal, iniciando acima e medialmente ao trocânter maior do fêmur e terminando próximo à fossa

poplítea, ao nível da inserção dos músculos ísquiotibiais (Figura 11 A). A exposição do nervo ciático foi obtida após a divulsão dos músculos semitendinoso e reto femoral (Figura 11 B). Com o auxílio de uma pinça hemostática não-serrilhada (Baptista, Gomes et al. 2007), foi realizado o esmagamento do nervo ciático direito por 30 segundos, apertando até o primeiro estágio da gramalheira da pinça, aproximadamente 10 mm acima da trifurcação do nervo (BRIDGE et al., 1994) (Figura 11 C - D). Em seguida, um fio de sutura estéril não-absorvível (9-0) foi amarrado na bainha epineural para marcar o local do esmagamento (análise histológica) (REINECKE et al., 2003). Logo após, a divulsão muscular foi reparada com 3 pontos de sutura com fio absorvível (5-0) e realizada a assepsia no local com anti-séptico (Povidine®). Ao final dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos em sala aquecida até a completa recuperação da anestesia. Todos os grupos experimentais foram operados, com exceção dos animais do grupo Sham, submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, embora o nervo ciático não tenha sido esmagado.

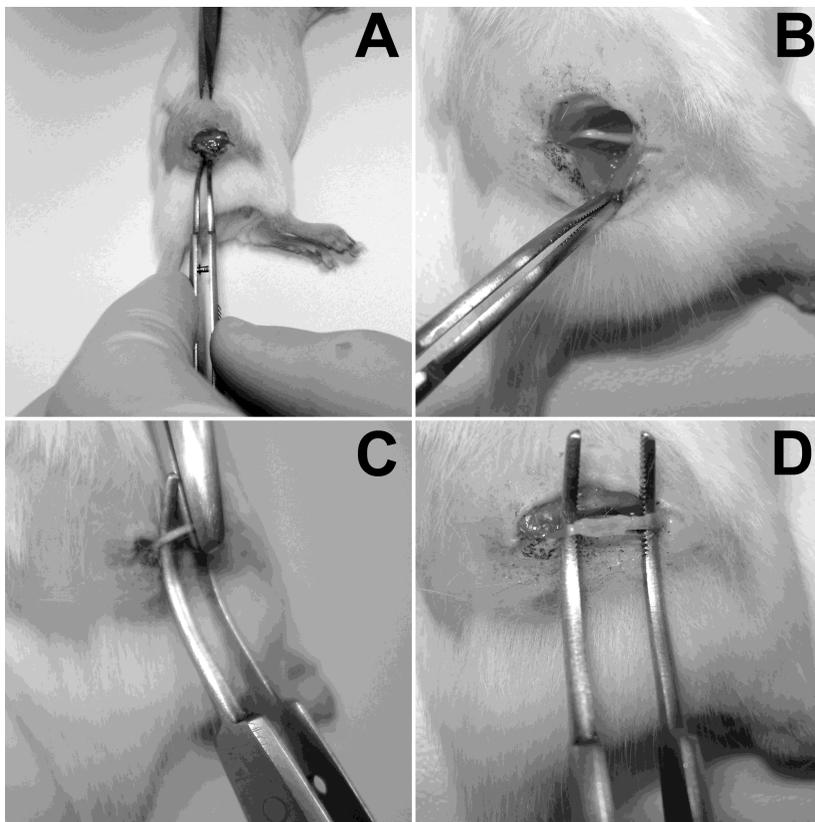


Figura 11 – Esmagamento do nervo ciático em camundongos.

(A) Incisão; (B) Nervo ciático exposto; (C) Esmagamento do nervo ciático; (D) Nervo após esmagamento.

### 3.4 HIPERSENSIBILIDADE MECÂNICA

#### 3.4.1 Filamentos de von Frey

A hipersensibilidade mecânica foi avaliada de acordo com o método desenvolvido por Dixon (DIXON, 1980; CHAPLAN et al., 1994), modificado para camundongos (SOMMER; SCHAFERS 1998). Os animais foram aclimatados, por uma hora, em compartimentos

individuais de acrílico (9 cm x 7 cm x 11 cm) sobre uma plataforma de fundo gradeado (Figura 12 A). O estímulo mecânico foi direcionado perpendicularmente à superfície plantar dos animais (Figura 12 B). Foram analisadas as respostas (retirada ou não da pata) em relação à tensão aplicada por filamentos de von Frey (VFH; Stoelting, Chicago, EUA) calibrados para produzir forças que produzem diferentes graus de estimulação mecânica (inócua ou nociva).

As sessões iniciaram com a aplicação do filamento 0,04g. Quando o estímulo era nocivo – indicado pela retirada da pata – era utilizado filamento com menor valor em (g). Quando o estímulo era inócua – indicado pela permanência da pata – era apresentado o filamento com maior valor subsequente em (g) a partir da última resposta, num total de no máximo seis testes não consecutivos. A seqüência resultante de respostas positivas e negativas foi utilizada para interpolar a força correspondente a 50% do limiar de retirada da pata (em gramas, g).

Os grupos foram avaliados antes do procedimento cirúrgico e nos dias pós-operatórios de 7, 10, 13, 16, 19 e 21, antes e 30 min após LEDT.

### **3.4.2 Força de Preensão**

A avaliação da força de preensão do membro posterior após ENC foi utilizada como uma medida comportamental de hipersensibilidade mecânica, como é comumente utilizada para avaliar a hiperalgesia muscular (KEHL et al. 2000; SUAREZ-ROCA et al. 2006; AVILA-PENA et al. 2007; HORI et al. 2010). A força máxima de preensão de cada membro posterior do animal, foi mensurada por meio de um dinamômetro, disponível comercialmente (Instrutherm, Instrumentos de Medição, São Paulo, Brasil - Figura 12 C). Durante os testes, permitia-se que cada animal agarrasse a grade de arame (10×12 cm) presa ao dinamômetro, com um único membro traseiro. O experimentador, em seguida, movia o animal na direção rostro-caudal até que o mesmo soltasse a grade. Cada animal foi testado seqüencialmente três vezes com intervalo de cerca de 2-3 minutos para obter a força de preensão unilateral média para o membro posterior. Desta forma, a força de preensão do membro posterior operado e não operado de cada animal foi obtida. Os dados finais apresentados foram calculados como sendo a diferença entre os do membro unilateral e o contralateral ao ENC a fim

de compensar por diferenças individuais. O teste foi realizado antes do procedimento cirúrgico e nos dias pós-operatório 7, 10, 13, 16, 19 e 21, antes e 30 min após LEDT.

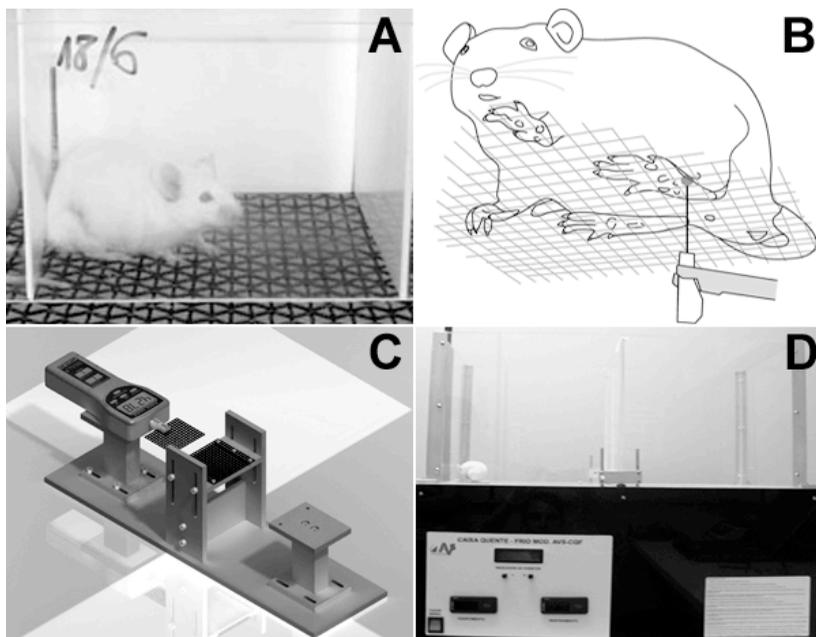


Figura 12 – Avaliação da hipersensibilidade.

(A) Camundongo sobre a plataforma de fundo gradeado; (B) Esquema de avaliação da hipersensibilidade mecânica com filamentos de von Frey; (C) Aparelho utilizado avaliação da força de preensão; (D) Placa fria.

Fonte: (B) Adaptado de Decosterd e Berta (2009).

### 3.5 HIPERSENSIBILIDADE AO FRIO

Hipersensibilidade ao estímulo frio foi avaliada utilizando o teste de placa fria (CQF, AVS, São Paulo, Brasil – Figura 12 D), conforme descrito por Bennett e Xie (1988), com pequenas modificações. Os animais foram colocados em um cilindro de vidro sobre a superfície fria da placa ajustada a uma temperatura de  $10 \pm 1^\circ\text{C}$ . Durante 2 minutos o comportamento de retirada da pata da superfície, balanço repetido, mordida ou lambida na pata foi registrado, além do tempo de latência

até o início do comportamento. Os grupos foram avaliados antes do procedimento cirúrgico e nos dias pós-operatórios de 7, 10, 13, 16, 19 e 21, antes e 30 min após LEDT.

### 3.6 ÍNDICES DO NERVO CIÁTICO

As análises foram feitas em uma pista de marcha confeccionada de MDF e vidro, com 50 cm de comprimento, 4,5 cm de largura e 10 cm de altura para as proteções laterais. O fundo da pista é feito de vidro, abaixo da pista há um espelho em um ângulo de 45° de inclinação (DIJKSTRA et al. 2000; BAPTISTA et al. 2007) (Figura 13 A). Durante os 10 primeiros dias que antecederam a cirurgia, os animais receberam treinamento diário para se familiarizarem com a pista de marcha.

A digitalização da marcha dos animais foi obtida através de uma câmera filmadora digital Panasonic PV-GS19 Mini DV, posicionada a 1 m de distância da pista de marcha, acoplada a um microcomputador (IBM-PC compatível genérico). As capturas continham imagens da marcha dos animais em perfil, e através de um espelho colocado embaixo da pista num ângulo de 45o de inclinação, as pegadas dos animais. Através do programa “Pinnacle Studio” versão 8.0 as filmagens foram armazenadas (formato mpeg, 640 x 480 pixels / polegadas, taxa de amostragem 1096 K bps e escrutinadas “off – line”, etapa em que foram isolados diversos “frames” utilizados para cálculo do parâmetros dos índices no programa “Image-J” (versão 1.30, National Instituto of Health; 2003).

As imagens obtidas durante a marcha dos animais foram utilizadas para o cálculo do Índice Funcional do nervo Ciático (IFC). Para calcular o Índice Estático do nervo Ciático (IEC) imagens são obtidas com os animais em posição de repouso, sobre a pista de marcha, em espaço delimitado em 10 cm por barreiras que evitam que os animais caminhem livremente.

A partir das imagens coletadas os seguintes parâmetros foram obtidos: distância do calcanhar ao topo do terceiro dedo (PL), que depende da ativação do músculo gastrocnêmio e distância entre o primeiro e quinto dedo (TS) influenciada pelos músculos extensores e intrínsecos da pata (BRAIN et al, 1989) (Figura 13 B-D). Estes

dados foram coletados do lado não operado (NPL e NTS) e do lado operado, pata experimental (EPL e ETS).

Para o cálculo do Índice Funcional do nervo Ciático (IFC) foi utilizada a seguinte fórmula (Inserra, Bloch et al. 1998):

$$IFC = 118.9 \times TSF - 51.2 \times PLF - 7.5. , \text{ onde, } TSF = (ETS - NTS) / NTS; PLF = (EPL - NPL) / NPL$$

Para o cálculo do Índice Estático do nervo Ciático (IEC) foi utilizada a seguinte fórmula (BAPTISTA et al., 2007):

$$IEC = 101.3 \times TSF - 54.03 \times PLF - 9.5., \text{ onde, } TSF = (ETS - NTS) / NTS; PLF = (EPL - NPL) / NPL$$

Em ambos os índices, um valor de 0 corresponde à função normal (ie, ambos os lados com o mesmo grau funcional) e um valor de -100 corresponde à completa perda de função de um lado. O teste foi realizado antes do procedimento cirúrgico e nos dias pós-operatórios de 7, 10, 13, 16, 19 e 21.

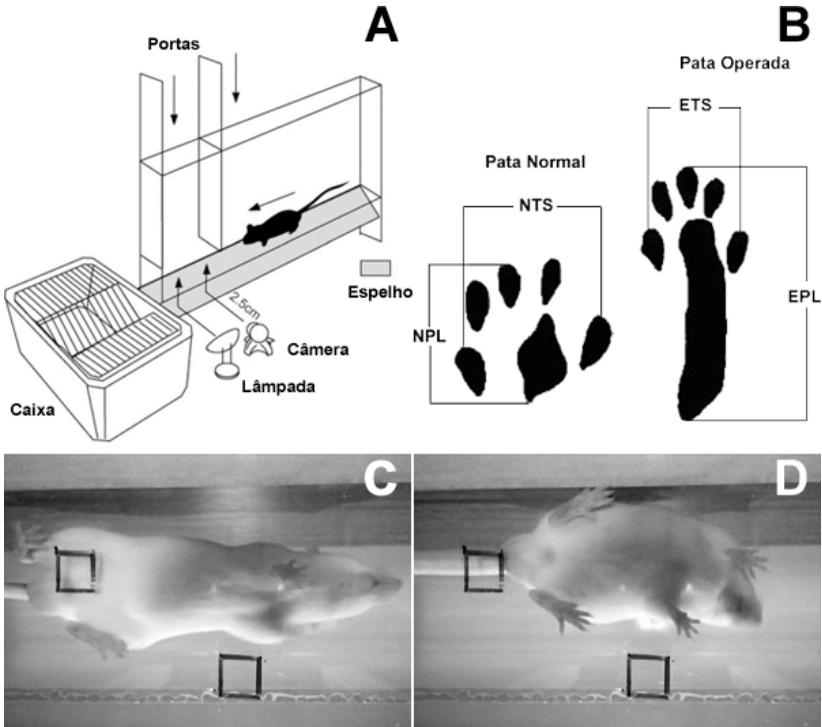


Figura 13 – Índices funcional e estático do ciático.

(A) Esquema da plataforma para avaliação dos índices do nervo ciático; (B) Esquema representativo das medidas avaliadas nos índices; (C) Foto da marcha camundongo sobre a plataforma utilizada na avaliação do IFC; (D) Foto de camundongo em repouso sobre a plataforma utilizada na avaliação do IEC. Fonte: (A-B) Adaptado de Baptista et al. (2007).

### 3.7 HISTOLOGIA E ANÁLISE MORFOMÉTRICA

#### 3.7.1 Preparação das Amostras

No 21º dia após o esmagamento do nervo ciático, os camundongos foram eutanasiados, por deslocamento cervical. O nervo ciático foi retirado através de uma nova incisão no mesmo local da utilizada no procedimento inicial.

As amostras foram fixadas em uma solução de formalina zinco (cloreto de zinco 1.6%, formaldeído 4%, acetato de cálcio 20%) durante 24 horas. Após a fixação, as amostras foram colocadas em dicromato de potássio a 5% por 5 dias. Passado esse período, as amostras foram lavadas em água corrente e deixadas na água por toda noite para retirar todo o dicromato antes da desidratação gradual com etanol. Em seguida, foi seccionado segmento do nervo de 5 mm, 3 mm distalmente à lesão. Depois de uma cuidadosa desidratação em etanol, foi utilizada a metodologia de rotina (CARGNIN-FERREIRA; SARASQUETE 2008), para a inclusão em parafina 58°C, utilizando como líquido intermediário o xilol e levando a cabo os seguintes passos: Desidratação e inclusão em parafina: Etanol 70% (mínimo 24 horas), Etanol 80% (45 minutos), Etanol 90% (45 minutos), Etanol absoluto 100% I (45 minutos), Etanol absoluto II (45 minutos), Etanol-Xilol 1/1 (45 minutos), Xilol I (45 minutos), Xilol II (45 minutos), Parafina I (1 hora), Parafina II (1 hora), Parafina III (1 hora). O material incluído verticalmente em parafina e cortado em amostras de 5 µm em micrótomo Leica RM 2025. Os cortes foram então estirados e recolhidos em um banho termostático a 52°C e dispostos sobre lâminas.

### **3.7.2 Técnicas Histomorfológicas**

Os cortes obtidos foram desparafinizados e hidratados segundo a metodologia de rotina e corados com a técnica de Cason (CARGNIN-FERREIRA; SARASQUETE 2008) e “*Oil Red*” (KIERNAN, 2004) descritas a seguir: As preparações histológicas foram dispostas numa solução de Orange G (1%), Fucsina Ácida (1%), Azul de Anilina (1%) e ácido fosfotúngstico (1%) durante 5 minutos e depois em solução hidroalcolólica “*Oil Red*” (1%) por 1 minuto. Passado esse tempo, as lâminas foram lavadas para retirada do excesso de corante, desidratadas e montadas em meio de montagem aquoso.

### **3.7.3 Tratamento das Imagens**

A análise histológica foi realizada em corte transversal da porção distal do nervo direito restrita ao tecido conjuntivo e à área de bainha mielinizada. As imagens foram adquiridas usando-se uma câmera digital

de microscopia modelo TA – 0124-A, conectada a um microscópio de luz DME (Leica). As imagens foram capturas em aumento de 400x e 1000x para análise no programa Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, Maryland). Posteriormente, as imagens foram analisadas em um programa de imagem (Chptool) desenvolvido pelo Projeto Cyclops (Depto. De informática – UFSC) para análises histopatológicas para o Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário.

### **3.7.4 Morfometria**

Os critérios de seleção dos cortes foram a integridade da morfologia do nervo, particularmente do perineuro, qualidade da coloração, ausência de artefatos de técnicas (rachaduras, dobras). Depois de corados, os cortes foram observados e fotografados com microscopia de luz e uma série de 4 parâmetros foram quantificados: (1) densidade de fibras mielinizadas (fibras/área: 150×150 pixels. Área delimitada a partir das imagens coletadas) e (2) área da bainha de mielina ( $\mu\text{m}$ ). Para este último parâmetro, foi escolhida uma área representativa, na qual foram contados 10 axônios íntegros. (3) Área de fibras mielinizadas (%) e (4) área de tecido conjuntivo (%). Os dados finais apresentados foram efetuados a partir da média dos valores obtidos em três imagens diferentes de cada animal avaliado (Figura 14 A-D).

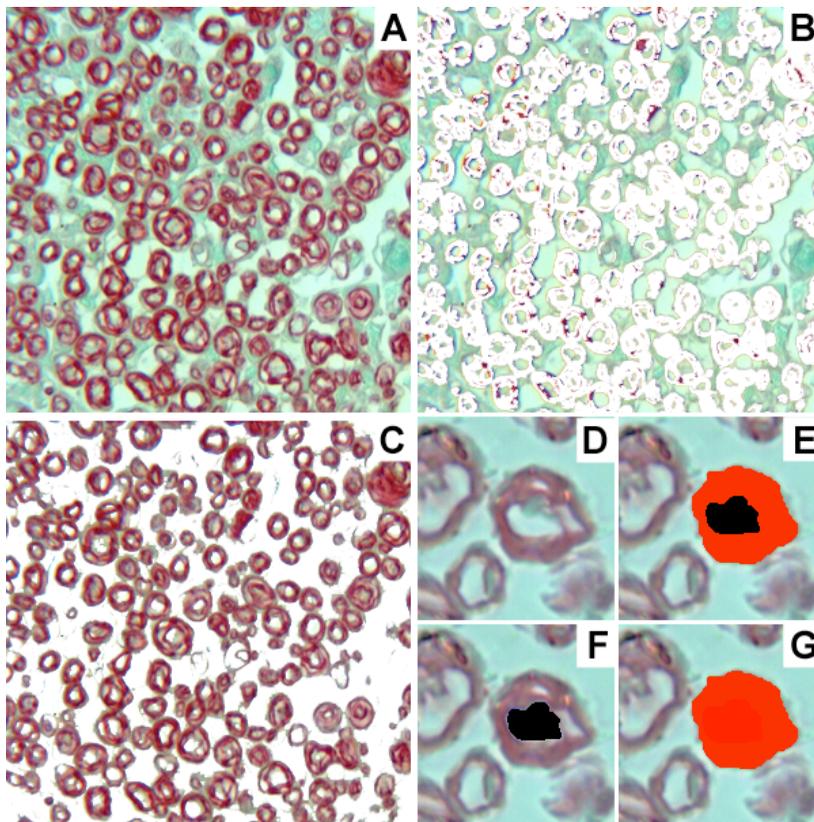


Figura 14 – Análise morfométrica do nervo ciático.

(A) Porção distal do nervo ciático no aumento de 400x; (B) Quantificação da área de tecido conjuntivo; (C) Quantificação da área de fibras mielinizadas; (D) Porção distal do nervo ciático no aumento de 1000x para quantificação da área da bainha de mielina; (E) Quantificação da área de bainha de mielina é feita subtraindo-se o valor da área preta em (F) da área em (G). As seções foram coradas com Cason e “oil red”.

### 3.8 MASSA MUSCULAR DO MEMBRO POSTERIOR

Para investigar os possíveis efeitos da LEDT na prevenção da perda de massa muscular desencadeada pelo ENC, foi avaliado o peso dos músculos sóleo e gastrocnêmio (músculos inervados pelo nervo

tibial, uma ramificação do nervo ciático, indiretamente afetados pela lesão do ENC) dos diferentes grupos experimentais no final dos experimentos crônicos, i.e., no dia 21 após a lesão.

Para tanto os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e pesados. Em seguida os músculos sóleo e gastrocnêmio direito foram coletados e imediatamente pesados. A fim de normalizar os dados, evitando-se a influência espúria do tamanho dos animais no peso do músculos, os mesmos foram calculados com a fórmula: VALOR FINAL= peso do músculo x 10 / peso do animal.

### 3.9 ATIVIDADE LOCOMOTORA

O teste de campo aberto foi usado para excluir a possibilidade de que a ação antinociceptiva da terapia por LED possa estar relacionada com efeitos inespecíficos, tanto em nível central quanto periférico, sobre a atividade locomotora dos animais. O comportamento dos animais foi verificado conforme descrito previamente (Rodrigues, da Silva et al. 2002). O aparato consiste em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm. O assoalho da arena é dividido em 12 quadrados iguais, e o número de cruzamentos com todas as patas (*crossing*) e o número de vezes que o animal fica de pé nas duas patas posteriores (*rearing*) foram contados cumulativamente durante 6 min. O teste foi realizado no dia 13 após ENC, 30 min após a LEDT.

### 3.10 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS

No 13º dia após o esmagamento do nervo ciático (após 7 tratamentos consecutivos), os camundongos foram sacrificados, por deslocamento cervical. A medula espinal e nervo ciático direito dos camundongos foram coletadas, homogeneizadas com tampão contendo inibidores de proteinases e utilizadas para avaliação dos níveis de citocinas por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (MIZGERD et al., 2001).

Alíquotas de 100 µl da amostra foram utilizadas para medir os níveis de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-1 $\beta$  e IL-10 usando kits ELISA para avaliação de citocinas de camundongo (R & D Systems, Minneapolis, MN), de acordo com as instruções do fabricante.

A absorvância das citocinas acima foi medida utilizando um leitor de microplacas a 450 e 550 nm. Ao final, os valores das amostras foram normalizados através do método de Bradford, técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “*Coomassie brilliant blue*” BG-250, a 620 nm. Os dados totais foram assim expostos em picrogramas de citocina por miligrama de proteína.

### 3.11 DROGAS

As seguintes substâncias foram utilizadas: isoflurano (Abbott Limited, Brasil), cetamina (Vetbrands Limited, Brasil); xilazina (Carlier SA, Barcelona, Espanha). Níveis de citocinas foram avaliados utilizando-se kits ELISA R & D Systems. Finalmente, tween, PMSF, EDTA, Aprotinina A e cloreto de benzametônio (Estados Unidos Biológicas, MA, EUA) foram usados nos ensaios para a determinação das citocinas.

### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados no programa Graph-Pad 5 (San Diego, CA, EUA) e apresentados como média + erro padrão da média (EPM). Valores de  $P < 0,05$  foram considerados indicativos de significância. Dados de hipersensibilidade mecânica, térmica ao frio, força de prensão e índices funcional e estático do nervo ciático foram avaliados através do teste Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Para análise estatística dos resultados morfométricos e daqueles referentes ao peso muscular, campo aberto, avaliação das citocinas e área sobre a curva foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido por Newman Keuls.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 EFEITO DA LEDT NA HIPERSENSIBILIDADE MECÂNICA

A lesão por ENC induziu desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica na pata ipsilateral dos camundongos operados do 7º ao 19º dia após o procedimento cirúrgico em relação ao grupo sham (Figuras 15 A e 16 A-D).

Os resultados apresentados na figura 15 A mostram que a LEDT, irradiada na face medial do membro posterior direito nas fluências de 2,5 e 4 J, inibiu significativamente a hipersensibilidade mecânica induzida pelo ENC, com efeito por uma hora. Os valores de inibição 30 min após o tratamento foram de  $62 \pm 14\%$  para 2,5 J, e  $60 \pm 8\%$  para a fluência de 4 J. Contudo, o tratamento com o dispositivo LED desligado (grupo Off) bem como o efetuado com a fluência de um 1 J não inibiram a hipersensibilidade mecânica induzida pelo ENC (Figura 15 A).

Uma vez que 2,5 J requer menos tempo de irradiação (32 segundos) e seu efeito não diferiu estatisticamente do resultado obtido com a fluência de 4 J (50 segundos de irradiação), conforme indicado pelo análise da área sobre a curva (AUC - Figura 15 B), todos os experimentos subseqüentes foram realizados com a fluência de 2,5 J.

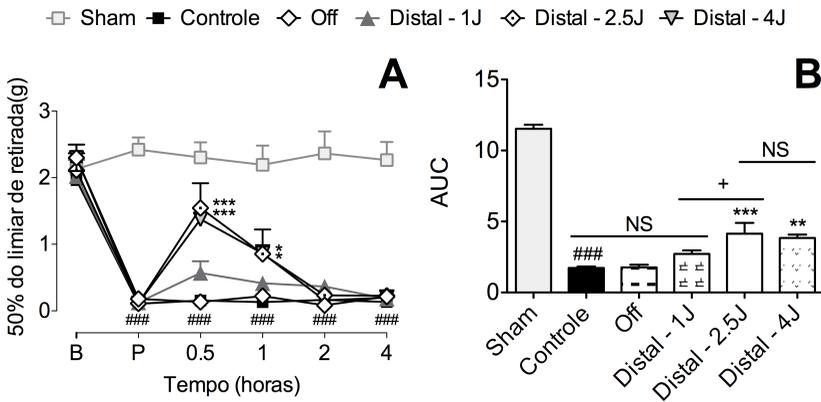


Figura 15 – Avaliação da Hipersensibilidade mecânica: diferentes fluências. (A) Efeito da LEDT em diferentes fluências sobre a hipersensibilidade mecânica induzida pelo ENC em camundongos (950 nm, 1 J, 2.5 J e 4 J); (B) Área sobre a curva correspondente (AUC). “B” corresponde a avaliação anterior ao procedimento cirúrgico; “P” indica avaliação antes de cada tratamento. Os dados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM),  $N = 8$  animais. (\*) representa a comparação entre os grupos tratados em relação ao grupo controle; (#) denota a comparação entre os grupos sham e controle (+) indica comparação entre os grupos tratados. NS significa não significativo. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ### $p < 0.001$ , + $p < 0.05$ . A estatística foi realizada por análise de variância de duas vias (two-way-ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni ou one-way ANOVA seguida de Newman-Keuls Teste de comparação múltipla (AUC).

Os resultados apresentados na figura 16 A demonstram que a LEDT diminuiu a hipersensibilidade mecânica produzida pelo ENC em ambos locais de irradiação, ou seja, nos grupos local e distal. Efeitos mais pronunciados foram observados no grupo distal, em ambos os tratamentos agudo e crônico, como indicado pela área sob a curva na figura 16 B e 16 D, respectivamente.

Valores de inibição da LEDT 30 min após o tratamento foram de  $62 \pm 14\%$  para o grupo distal e  $49 \pm 6\%$  para o grupo local (Fig. 3A). O tratamento crônico com LEDT apresentou os valores inibição máxima de  $71 \pm 12\%$  para o grupo distal no 13º dia pós-operatório, e  $63 \pm 12\%$  para o grupo local no 10º dia pós-operatório (Figura 16 C).

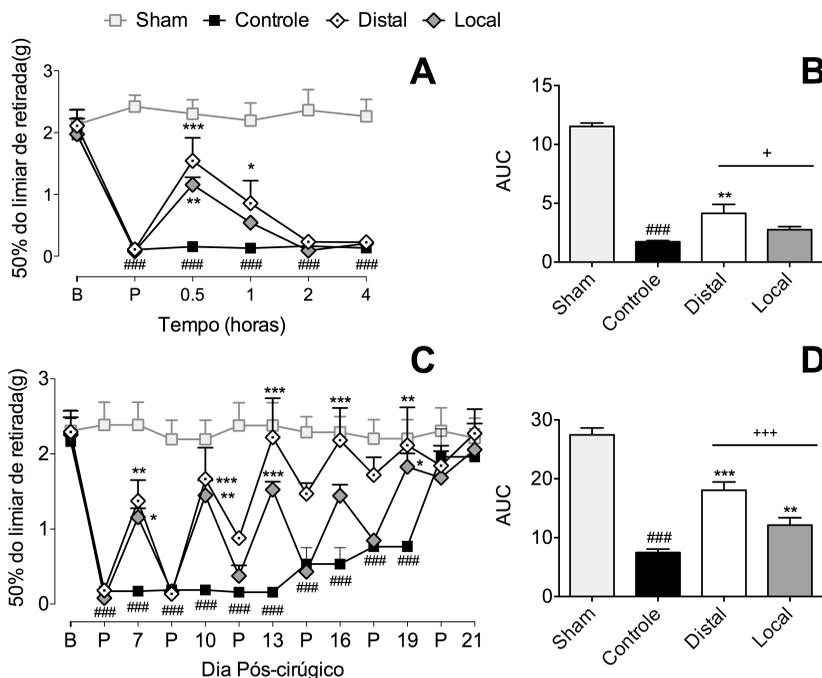


Figura 16 – Avaliação da hipersensibilidade mecânica no teste de von Frey. Efeito da LEDT sobre a hipersensibilidade mecânica induzida pelo ENC em camundongos. (A) Decurso temporal do efeito agudo da LEDT (950 nm, 2.5 J) e (B) AUC correspondente; (C) efeito do tratamento crônico e (D) AUC correspondente. “B” corresponde a avaliação anterior ao procedimento cirúrgico; “P” indica avaliação antes de cada tratamento. Os dados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM),  $N = 8$  animais. (\*) representa a comparação entre os grupos tratados em relação ao grupo controle; (#) denota a comparação entre os grupos sham e controle (+) indica comparação entre os grupos tratados. NS significa não significativo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , #### $p < 0.001$ , +++ $p < 0.001$ . A estatística foi realizada por análise de variância de duas vias (two-way-ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni ou one-way ANOVA seguida de Newman-Keuls Teste de comparação múltipla (AUC).

Além disso, a lesão por ENC reduziu a força de preensão na pata ipsilateral dos camundongos operados do dia 7 ao 19 após o procedimento cirúrgico (Figura 17 A). A LEDT em ambos os grupos, local e distal, induziu aumento da força de preensão dos animais. Efeitos mais pronunciados foram obtidos no grupo distal, como indicado pela

AUC (Figura 17 B). Os valores de inibição máxima do tratamento crônico com a LEDT foram de  $91 \pm 3\%$  para o grupo distal, e  $37 \pm 7\%$  para o grupo local, ambos no 16º dia pós-operatório.

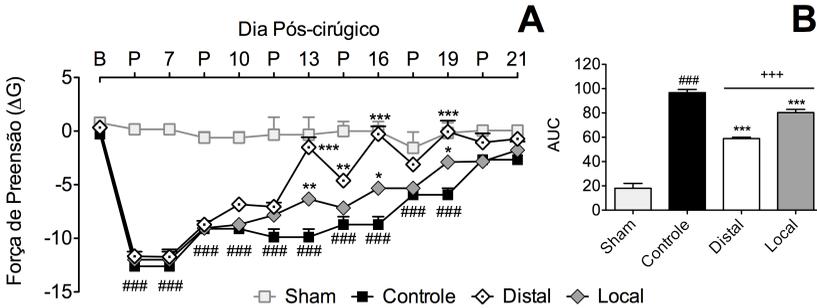


Figura 17 – Avaliação da força de preensão.

(A) Efeito da LEDT (950 nm, 2.5 J) sobre a força de preensão do membro posterior direito de camundongos após ENC e (B) AUC correspondente. “B” corresponde a avaliação anterior ao procedimento cirúrgico; “P” indica avaliação antes de cada tratamento. Os dados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), N = 8 animais. (\*) representa a comparação entre os grupos tratados em relação ao grupo controle; (#) denota a comparação entre os grupos sham e controle (+) indica comparação entre os grupos tratados. NS significa não significativo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , #### $p < 0.001$ , +++ $p < 0.001$ . A estatística foi realizada por análise de variância de duas vias (two-way-ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni ou one-way ANOVA seguida de Newman-Keuls Teste de comparação múltipla (AUC).

## 4.2 EFEITO DA LEDT NA HIPERSENSIBILIDADE AO FRIO

Em seguida, os efeitos da LEDT (950 nm, 2,5 J) sobre a hipersensibilidade ao frio induzida pelo ENC foram investigados. O procedimento cirúrgico resultou em diminuição do tempo de latência para o início dos comportamentos relacionados à hipersensibilidade (retirada da pata da superfície, balanço repetido, mordida ou lambida na pata), com correspondente aumento no tempo total de reação, nos animais do grupo controle nos dias 7 a 19 após o procedimento cirúrgico (Figura 18 A-D).

A LEDT no grupo distal inibiu significativamente a hipersensibilidade ao frio induzida pelo ENC, aumentando o tempo de

latência e diminuindo o tempo total de reação, entretanto apenas após 7 tratamentos consecutivos, dia 13 e ainda no dia 16 pós-operatório (Figura 18 C).

O tratamento crônico induziu valores máximos de inibição para o grupo distal de  $68 \pm 15\%$  para a latência e  $84 \pm 7\%$  para o tempo total de reação ambos no 16º dia pós-operatório.

Por outro lado, a LEDT irradiada no local do esmagamento (grupo local) não foi capaz de inibir significativamente a hipersensibilidade ao frio induzida pelo ENC.

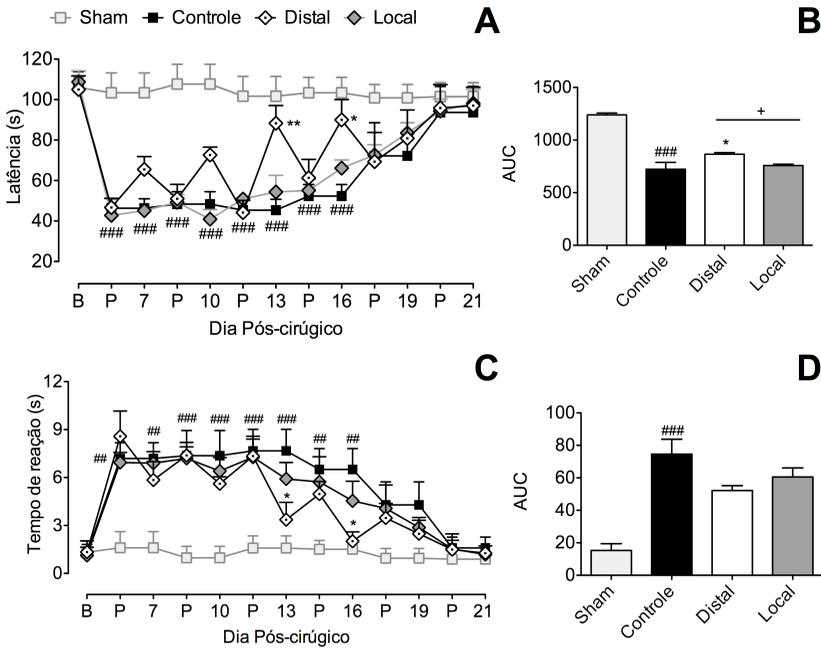


Figura 18 – Avaliação da hipersensibilidade térmica ao frio. Efeito da LEDT (950 nm, 2.5 J) sobre a hipersensibilidade mecânica induzida pelo ENC em camundongos. (A) Tempo de latência para início dos comportamentos indicativos de nocicepção térmica e (B) AUC correspondente. (C) Tempo total de reação (D) AUC correspondente. “B” corresponde a avaliação anterior ao procedimento cirúrgico; “P” indica avaliação antes de cada tratamento. Os dados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), N = 8 animais. (\*) representa a comparação entre os grupos tratados em relação ao grupo controle; (#) denota a comparação entre os grupos sham e controle (+) indica comparação entre os grupos tratados. NS significa não significativo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ### $p < 0.01$ , #### $p < 0.001$ , + $p < 0.05$ . A estatística foi realizada por análise de variância de duas vias (two-way-ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni ou one-way ANOVA seguida de Newman-Keuls Teste de comparação múltipla (AUC).

### 4.3 EFEITO DA LEDT NA RECUPERAÇÃO FUNCIONAL

A lesão por ENC induziu comprometimento funcional no membro posterior ipsilateral a cirurgia dos camundongos, com função motora gradualmente restaurada durante o período de avaliação, ou seja, a partir do dia 7 até o dia 19 após o procedimento cirúrgico. Tratamento crônico com LEDT não foi capaz de acelerar essa recuperação funcional (Figura 19 A-D).

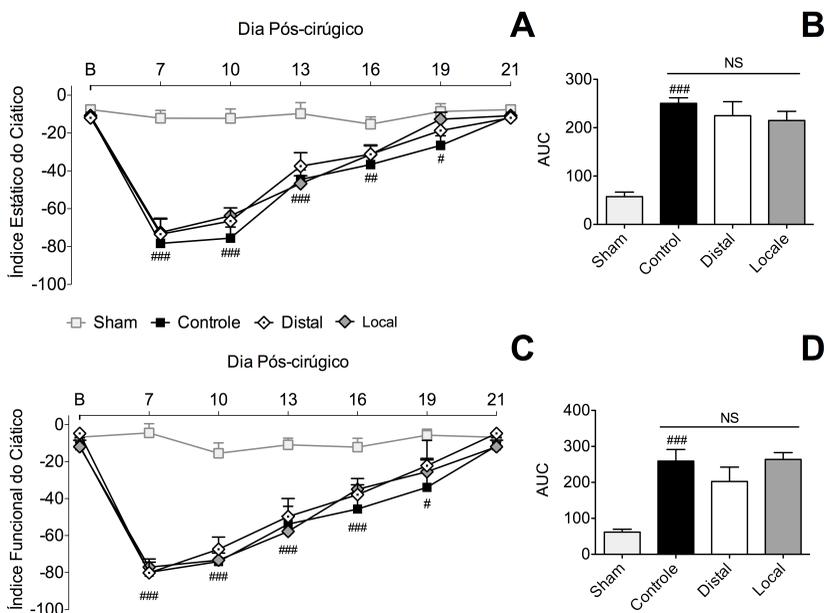


Figura 19 – Avaliação dos índices do nervo ciático.

Efeito da LEDT (950 nm, 2.5 J) em camundongos submetidos ao ENC. (A) Avaliação do índice estático do ciático com (B) correspondente AUC; (C) Índice funcional do nervo ciático com (D) AUC correspondente. “B” corresponde a avaliação anterior ao procedimento cirúrgico; “P” indica avaliação após o procedimento cirúrgico. Os dados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM),  $N = 8$  animais. (#) denota a comparação entre os grupos sham e controle. NS significa não significativo. # $p < 0.05$ , ### $p < 0.01$ , #### $p < 0.001$ . A estatística foi realizada por análise de variância de duas vias (two-way-ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni ou one-way ANOVA seguida de Newman-Keuls Teste de comparação múltipla (AUC).

#### 4.4 EFEITO DA LEDT NA REGENERAÇÃO NERVOSA

A análise morfométrica demonstra que os grupos submetidos ao ENC, em comparação ao grupo sham, apresentaram menor densidade de fibras mielinizadas (Figura 20 A), embora sem diferença estatística na área da bainha de mielina das fibras remanescentes (Figura 20 B). A lesão ocasionada pelo procedimento cirúrgico também provocou a redução da área das fibras mielinizadas com aumento correspondente da área do tecido conjuntivo (Figura 20 C-D). Tratamento crônico com LEDT não foi capaz de alterar qualquer dos parâmetros morfológicos acima referidos (Figura 20 A-D).

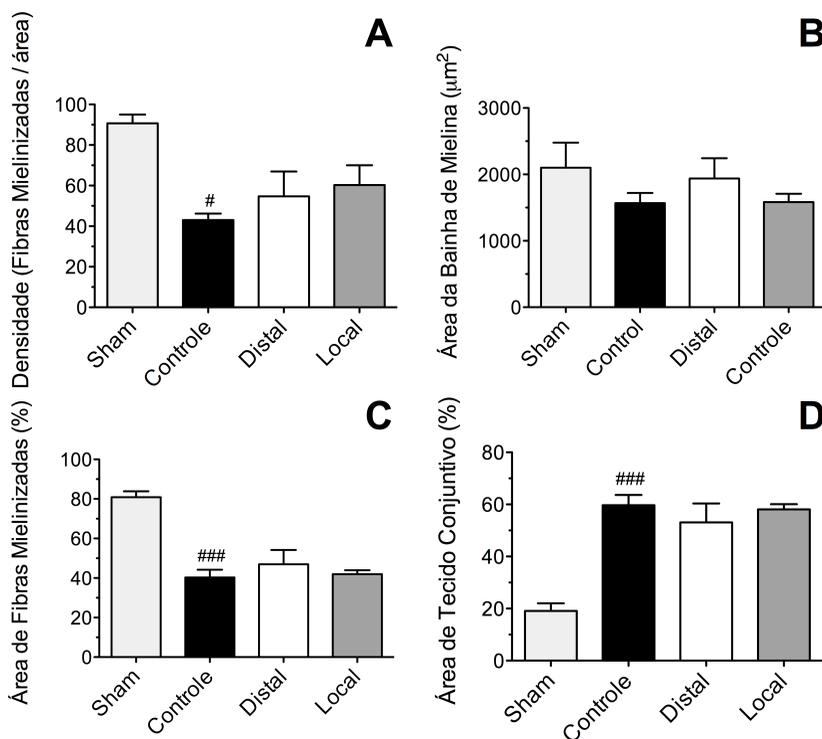


Figura 20 – Análise morfométrica do nervo ciático.

Efeito da LEDT (950 nm, 2.5 J) nos parâmetros morfométricos do nervo ciático de camundongos após ENC. (A) densidade de fibras mielinizadas (fibras/área), (B) área da bainha de mielina (µm), (C) área de fibras mielinizadas (%) (D) área de tecido conjuntivo (%). Os dados são expressos como a média ± erro padrão da média (EPM), N = 8 animais. (#) denota a comparação entre os grupos sham e controle. # $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$ . A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (one-way-ANOVA), seguida de Newman-Keuls Teste de comparação múltipla.

#### 4.5 EFEITO DA LEDT NA PERDA DE MASSA MUSCULAR

O procedimento cirúrgico resultou em uma diminuição da massa dos músculos sóleo e gastrocnêmio do membro posterior direito dos animais, como observado no material coletado no dia 21 após a lesão. O

tratamento crônico com LEDT não foi capaz de em reverter esta perda (Figura 21 AB).

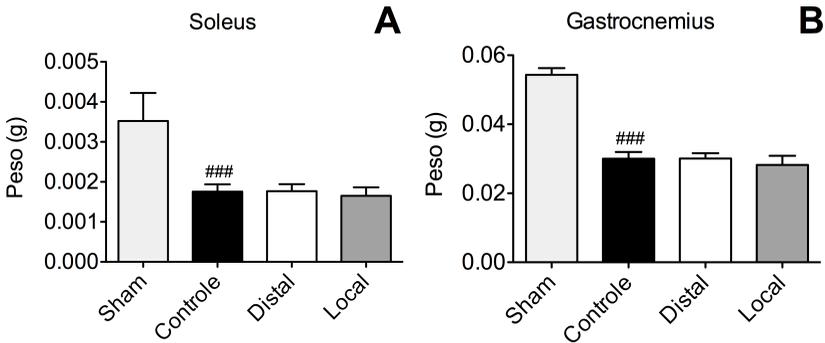


Figura 21 – Avaliação da massa muscular.

Efeito da LEDT (950 nm, 2.5 J) sobre o peso dos músculos (A) sóleo e (B) gastrocnêmio de camundongos após ENC. Os dados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), N = 8 animais. (#) denota a comparação entre os grupos sham e controle. ### $p < 0.001$ . A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (one-way-ANOVA), seguida de Newman-Keuls Teste de comparação múltipla.

#### 4.6 EFEITO DA LEDT NA ATIVIDADE LOCOMOTORA

Os dados apresentados na figura 22 demonstram que nem o procedimento cirúrgico (ENC), nem a LEDT afetaram a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto, realizado no dia 13 após ENC, 30 min após a LEDT.

Desta forma, a LEDT não parece estar diretamente associada com efeito sedativo inespecífico ou com atividade de relaxamento muscular que possa ter interferido na avaliações comportamentais.

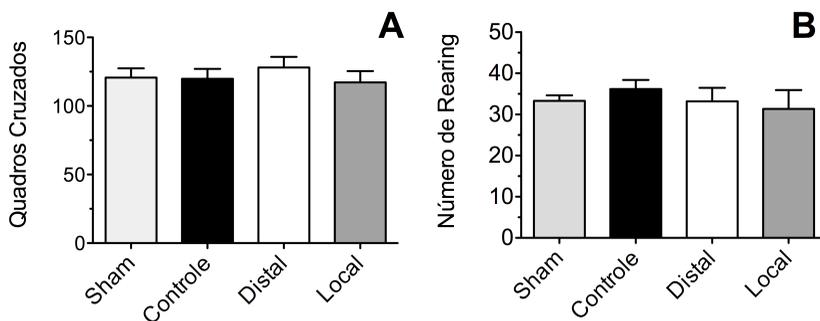


Figura 22 – Avaliação da atividade locomotora.

Efeito da LEDT (950 nm, 2.5 J) (A) no número de quadros cruzados e (B) comportamento de rearing dos camundongos submetidos ao ENC. Os dados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), N = 8 animais. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (one-way-ANOVA), seguida de Newman-Keuls Teste de comparação múltipla.

#### 4.7 EFEITO DA LEDT NOS NÍVEIS DE CITOCINAS

A medula espinal e o nervo ciático dos grupos de animais foram coletadas para análise de citocinas no 13<sup>o</sup> dia após o ENC, após sete tratamentos consecutivos com LEDT, uma vez que os melhores efeitos nos testes comportamentais foram obtidos nos dias 10 e 16 após a lesão. Os dados apresentados na figura 23 demonstraram que os animais do grupo controle, em comparação ao grupo sham, apresentaram níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , tanto na medula espinal como no nervo ciático. No entanto, a concentração de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) não diferiu entre os grupos experimentais, nem no nervo ciático, nem na medula espinal.

A LEDT no grupo local diminuiu significativamente os níveis de TNF- $\alpha$  tanto medula espinal como no nervo ciático, em comparação ao grupo controle, com valores de inibição de  $66 \pm 9\%$  e  $77 \pm 5\%$ , respectivamente (Figura 23 C, D).

Por outro lado, no grupo distal, a LEDT diminuiu significativamente os níveis de IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  na medula espinal. Os valores de inibição em relação ao grupo controle foram de  $49 \pm 8\%$  e  $40 \pm 6\%$ , respectivamente (Figura 23 A, C).

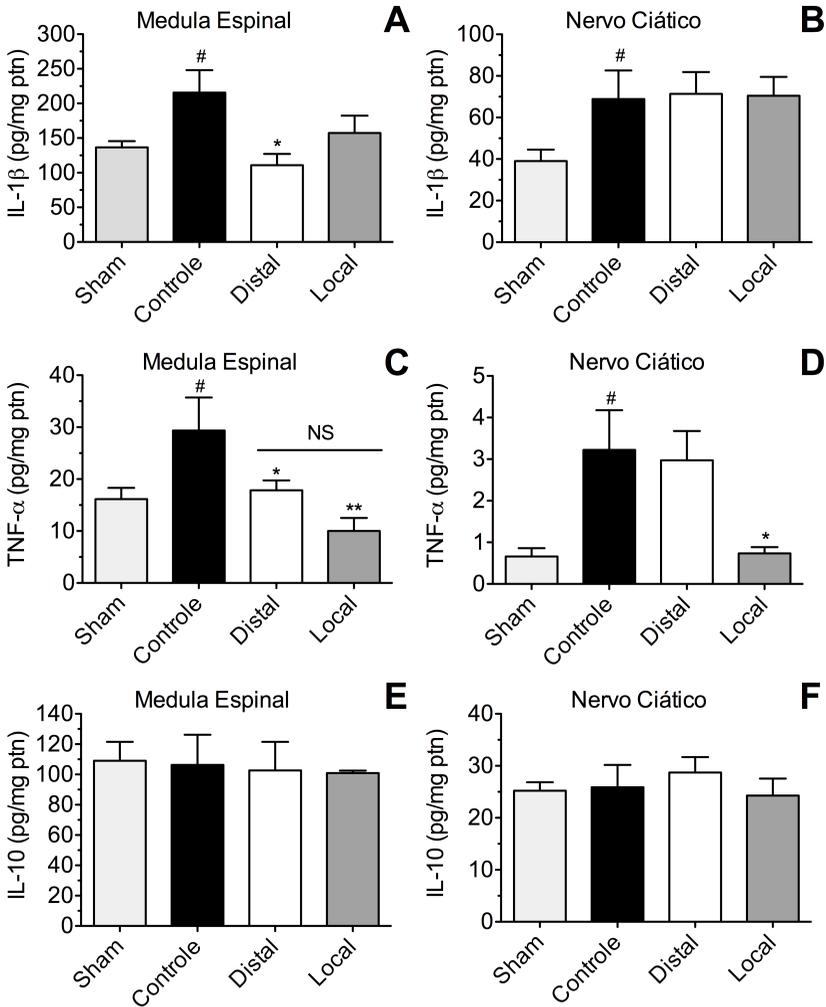


Figura 23 – Avaliação das citocinas anti e pró-inflamatórias.

Efeito da LEDT (950 nm, 2.5 J) nos níveis de citocinas na medula espinal (A) IL-1 $\beta$ , (C) TNF- $\alpha$  e (E), IL-10 e no nervo ciático (B) IL-1 $\beta$ , (D) TNF- $\alpha$  e (F) IL-10, de camundongos submetidos ao ENC. Os dados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), N = 8 animais. (\*) representa a comparação entre os grupos tratados em relação ao grupo controle; (#) denota a comparação entre os grupos sham e controle. NS significa não significativo. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, # $p$ <0.05. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (one-way-ANOVA), seguida de Newman-Keuls Teste de comparação múltipla.

## 5 DISCUSSÃO

A terapia por diodo emissor de luz (*Light-emitting diode therapy* – LEDT) é uma forma de fototerapia que utiliza como fonte de irradiação diodos emissores de luz (LEDs) (VINCK et al., 2005). Amplamente utilizada como uma ferramenta terapêutica na cicatrização de tecidos e tratamento de lesões de tecidos moles, a LEDT foi inicialmente desenvolvida pela *National Aeronautics and Space Administration* (NASA) a partir da observação de que a luz em comprimentos de onda específicos acelera o crescimento de plantas e a cicatrização de tecidos biológicos. Os estudos da NASA despertaram o interesse internacional para os efeitos biológicos e fisiológicos da irradiação com diodo emissor de luz, o que levou pesquisadores a verificar os efeitos da LEDT em diversas condições que variam de fins cosméticos ao tratamento de câncer de pele (BAROLET, 2008).

Estudos indicam que a irradiação emitida por LEDs na faixa espectral de 600-1200 nm penetra nos tecidos biológicos com menor perda, chegando a estruturas mais profundas (BAROLET, 2008) (Ver figura 9). Nesta faixa espectral, a LEDT modula a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno, promove a angiogênese, estimula macrófagos e linfócitos, melhorando o metabolismo energético das mitocôndrias e promove a produção de fatores de crescimento (EELLS et al., 2004; DESMET et al., 2006). Adicionalmente, em estudos *in vivo*, a LEDT apresentou atividade analgésica em 14 relatos de caso de dor crônica (COSTA et al., 2008), bem como em modelos animais de nocicepção aguda, como a estimulação elétrica da pata e o teste da formalina (LIMANSKY et al., 2006; TAMAROVA et al., 2009). Além disso, a LEDT estimulou o processo de reparação do tendão calcâneo em ratos (BASTOS et al., 2009; CASALECHI et al., 2009), fato este que abre caminho para investigação de um possível efeito regenerador da LEDT em modelos de lesão neuropática.

Não obstante os dados da literatura, a possível eficácia da LEDT na redução da hipersensibilidade, bem como na estimulação da regeneração nervosa e função motora após lesão nervosa não foi investigada. Desta forma, com este objetivo, o presente estudo investigou o efeito da LEDT na hipersensibilidade, regeneração nervosa e restauração da função motora no modelo de ENC em camundongos. Adicionalmente, a fim de contribuir para a compreensão dos mecanismos de ação da LEDT, avaliamos o papel das citocinas anti e

pró-inflamatórias na medula e nervo ciático de camundongos após a lesão por ENC.

Os resultados aqui apresentados fornecem, pela primeira vez, evidências que a LEDT (950 nm, a 80 mW/cm<sup>2</sup>, 2,5 J, a cada 24 horas durante 15 dias) foi capaz de reduzir a hipersensibilidade mecânica, bem como, após uma série de aplicações diárias, a hipersensibilidade térmica ao frio, sem entretanto ter sido capaz de acelerar a regeneração nervosa ou motora de camundongos submetidos ao modelo do esmagamento do nervo ciático. Além disso, nossos dados demonstram que a LEDT, de maneira seletiva de acordo com o sítio irradiado, diminuiu os níveis de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$ , tanto na medula espinal como no nervo ciático dos animais submetidos ao ENC. A Tabela 3 apresenta um resumo dos resultados obtidos no presente estudo.

**Tabela 3- Resumo dos resultados obtidos neste estudo.**

<b>Avaliações / Ensaios</b>	<b>IM – Grupo Local (950 nm - 2.5J)</b>	<b>IM – Grupo Distal (950 nm - 2.5J)</b>
Hipersensibilidade mecânica Filamentos de von Frey	49 $\pm$ 6% (30 min após tto agudo) - 63 $\pm$ 12% (dia 10 do tto crônico)	62 $\pm$ 14% (30 min após tto agudo) - 71 $\pm$ 12% ( dia 13 do tto crônico)
Hipersensibilidade mecânica Força de preensão	37 $\pm$ 7% (dia 16 do tto crônico)	91 $\pm$ 3% (dia 16 do tto crônico)
Hipersensibilidade ao frio Placa fria	NS	Latência: 68 $\pm$ 15% e tempo de reação: 84 $\pm$ 7% (dia 16 do tto crônico)
Atividade locomotora	NS	NS
Citocinas	TNF- $\alpha$ : nervo (77 $\pm$ 5%) e medula (66 $\pm$ 9%)	Medula: IL1- $\beta$ (49 $\pm$ 8%) e TNF- $\alpha$ (40 $\pm$ 6%)
Massa muscular	NS	NS
Índices do ciático	NS	NS
Morfometria	NS	NS

NOTAS: Valores de inibição máxima (IM) em relação ao grupo controle. Os animais do grupo local foram tratados no local do esmagamento, enquanto que os animais do grupo distal foram tratados no aspecto medial do membro posterior direito. NS, não significativo em relação ao grupo controle; TTO, tratamento.

O ENC foi o modelo de NP utilizado neste estudo por ter se demonstrado adequado, tendo sido amplamente empregado nas duas últimas décadas, para a avaliação do efeito de drogas diversas e outras abordagens terapêuticas, tanto na regeneração nervosa e retorno da função motora, assim como no tratamento da hipersensibilidade neuropática que se desenvolve a partir da lesão focal induzida por

trauma físico, neste caso específico, por esmagamento (CORONEL et al., 2008; NAIK et al., 2008; DECOSTERD et al., 2002; BESTER et al., 2000). Por ser um modelo de axoniotmese, a estrutura do nervo é preservada, ao menos em parte, facilitando a regeneração, bem como a avaliação da hipersensibilidade mecânica e térmica, sinais estes considerados representativos de dor neuropática em estudos translacionais (KONTINEN; MEERT, 2003). Além disso, murinos, em especial ratos e camundongos, têm sido freqüentemente utilizados no estudo da regeneração nervosa, não apenas pela facilidade de cuidado, fácil manejo e pequeno porte, mas principalmente, pela distribuição de seus troncos nervosos que se assemelham àqueles dos humanos (MACKINNON et al., 1985; RODRIGUEZ et al., 2004). Devido a estas características, este modelo de NP, i.e. ENC, tem contribuído para a compreensão dos efeitos de diversos agentes com potencial regenerador e analgésico. No entanto, até o momento, este é o primeiro estudo a empregá-lo para investigar os efeitos da LEDT.

É especialmente relevante neste estudo a demonstração do efeito da LEDT na redução da hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio, sinais estes representativos de dor neuropática em modelos animais de NP (KONTINEN; MEERT, 2003). Tal relevância se deve ao fato das NPs estarem entre os problemas neurológicos de incidência mais comum (ENGLAND; ASBURY, 2004). Não obstante, poucas terapias e intervenções estão disponíveis para impedir ou reverter os danos associados (ZOCHODNE, 2008). Adicionalmente, a grande maioria das NPs é acompanhada pelo desenvolvimento de dor neuropática, geralmente crônica, incapacitante e em grande parte resistente aos tratamentos farmacológicos (DWORKIN et al., 2003; FINNERUP et al., 2005; ATTAL et al., 2010), que freqüentemente produzem efeitos colaterais indesejáveis ou analgesia inadequada (NIEDERBERGER et al., 2008). Neste contexto, é mister o desenvolvimento de terapias que possam auxiliar no tratamento das NPs e/ou das dores neuropáticas associadas, em especial de terapias não invasivas, de baixo custo e que não produzam efeitos adversos, como pode vir a ser o caso da LEDT.

Em fototerapia, a correta escolha dos parâmetros de irradiação, que envolvem a seleção do comprimento de onda adequado e a dosimetria são essenciais para a obtenção do efeito terapêutico (ENWEMEKA, 2009). Os parâmetros da LEDT utilizados neste estudo são apresentados na Tabela 1. O comprimento de onda de 950 nm foi selecionado devido a sua capacidade de penetração nos tecidos biológicos (dentro da "janela terapêutica" para terapia fotônica - 600-1200 nm - figura 9) (NIEMZ, 2007). Além disso, Vinck et al. (2005)

demonstraram que a LEDT no comprimento de onda de 950 nm, com uma fluência de 1,07 J/cm<sup>2</sup>, irradiada sobre pele intacta no curso do nervo sural, reduziu a velocidade de condução nervosa (VCN) e aumentou a latência de pico negativo (LPN), resultando em um número reduzido de impulsos nervosos por unidade de tempo. Essas atividades neurofisiológicas da LEDT na condução nervosa sensorial sugerem seu provável emprego no tratamento da dor, concluem os autores.

A fluência utilizada no presente trabalho, por sua vez, foi determinada no experimento cujos resultados são apresentados na figura 15. A LEDT com as fluências de 2,5 J e 4 J, irradiada no aspecto medial do membro posterior direito dos animais, inibiu significativamente a hipersensibilidade mecânica induzida pelo ENC, com efeito que se estendeu por uma hora. Por outro lado, a fluência de 1 J não apresentou efeito significativo. Uma vez que 2,5 J requer menos tempo de irradiação e não difere estatisticamente do resultado obtido com 4 J, conforme indicado pela AUC (Fig. 15 B), todos os experimentos subsequentes foram realizados com a fluência de 2,5 J.

Em fototerapia a adequada determinação da densidade de energia (fluência) ou “dose adequada” é essencial para obtenção do efeito terapêutico. De fato, a dose deve ser calculada de acordo com o tipo de tecido irradiado, características físicas da área de irradiação, bem como efeito desejado (BAROLET, 2008). Não obstante as particularidades de cada caso, de uma maneira geral, a Lei de Arndt-Schultz provê a base teórica para a determinação da dosimetria. Tal lei postula que em densidades de irradiação mais baixas ocorre a bioestimulação, e que de maneira inversa, em densidades de irradiação mais altas, ocorre a bioinibição (figura 24) (BAXTER, 2003; TÚNER; HODE, 2004). Karu (1987) explica que doses ínfimas não seriam suficientes para promover efeitos biológicos importantes, e que o incremento da densidade de energia, para além de um determinado limiar, danificaria os fotoceptores, com conseqüente redução do metabolismo. Em conformidade com a lei de Arndt-Schultz, estudos indicam que a bioestimulação ocorre em densidades de energia entre 0,5 e 10 J/cm<sup>2</sup> (O’KANE; SHIELDS, 1994; YU; NAIM, 1997; SCHINDL et al., 2003), sendo a dose ótima para bioestimulação entre 0,5 e 4 J/cm<sup>2</sup> (TÚNER; HODE, 2004). Ainda que tais estudos tenham sido realizados com LASER de baixa intensidade, sugere-se que tais mecanismos são universais para os diferentes tipos de fototerapia de baixa intensidade, como é o caso da LEDT (BAROLET, 2008; VINCK et al., 2006). A fluência de 2,5 J utilizada no presente estudo se encontra dentro desta

janela de ótima bioestimulação indicada por e 4 J, conforme indicada por Túner e Hode (2004), i.e, entre 0,5 e 4 J/cm<sup>2</sup>.

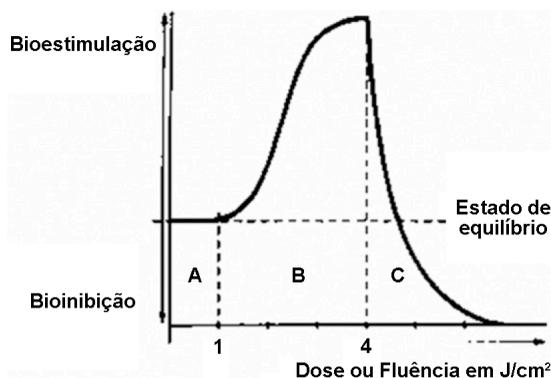


Figura 24 – Lei de Arndt-Schultz.

Biomodulação da atividade biológica frente a densidade de energia irradiada. (A) Pré-limiar ou ausência de ativação do metabolismo. (B) Bioestimulação, ativação dos processos biológicos. (C) Bioinibição.

Fonte: Adaptada de Barolet (2008).

Uma vez determinada a fluência, a partir deste ponto, dois diferentes locais de irradiação foram utilizados ao longo do estudo (Figura 10). O primeiro com objetivo de influenciar diretamente o nervo ciático e o tecido circundante no local do esmagamento (grupo local). O segundo foi a face medial do membro posterior direito (grupo distal). Este último foi escolhido porque, teoricamente, a menor quantidade de tecido entre a pele e o nervo subjacente, facilitaria a penetração e ação direta da radiação LEDT sobre o nervo tibial, ramificação do nervo ciático. Vale ressaltar que o segundo sítio coincide com a localização de pontos de acupuntura importantes, e.g. SP6, que apresenta ação analgésica, bem como atividade anti-inflamatória quando estimulado pela acupuntura (ALLAIS et al., 2003; WU et al., 2009; DUARTE DA SILVA et al., 2010; LIU et al., 2010), bem como por irradiação laser (O'REILLY et al., 2004; KEMPF et al., 2009).

Assim, os resultados aqui apresentados demonstram claramente o efeito da LEDT (950 nm, 2,5 J) na redução da hipersensibilidade induzida pelo ENC em camundongos. Quando irradiada em ambos os

sítios, local e distal, com efeitos mais pronunciados no último, a LEDT diminuiu a hipersensibilidade mecânica no teste de von Frey (Figura 16 A-B) e no teste da força de preensão (Figura 17). Por outro lado, apenas a irradiação da região distal foi capaz de inibir a hipersensibilidade ao frio (Fig. 18 A-B). O fato que resultados mais expressivos tenham sido obtidos com a irradiação do sítio distal pode ser devido às razões apontadas no parágrafo anterior, ou seja, devido a características físicas no sítio além de possível incremento no efeito analgésico induzido pela estimulação de acupontos ali presentes. No entanto, experimentos adicionais são necessários para a adequada elucidação destes achados.

É importante ressaltar que a capacidade da LEDT em reduzir a hipersensibilidade não se deve ao estresse induzido pela contenção, uma vez que a LEDT com o dispositivo desligado não alterou o limiar de sensibilidade dos animais (ver na figura 15 grupo off, o qual foi contido por 32 segundos com aparelho de LED posicionado na face medial do membro posterior direito a fim de reproduzir o tempo e condição de tratamento do grupo tratado com  $2,5 \text{ J/cm}^2$ ). Nem tampouco a LEDT pode ser associada à sedação inespecífica ou atividade de relaxamento muscular que possam ter interferido nas avaliações comportamentais, uma vez que o tratamento não alterou a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto (Figura 22).

Os mecanismos para a analgesia induzida pela LEDT são pouco compreendidos, ainda que esteja bem estabelecido que a terapia fotônica influencia a síntese, liberação e metabolismo de inúmeras substâncias sinalizadoras envolvidas na analgesia, tais como endorfinas, óxido nítrico, prostaglandinas, bradicinina, acetilcolina e serotonina (VINCK, 2006). Além desses efeitos neurofarmacológicos existem evidências experimentais da diminuição do processo inflamatório, aumento da circulação sanguínea e diminuição da atividade das fibras C (GRECO et al., 1989; VACCA et al., 1993; VACCA et al., 1994; REDDY, 2004, VINCK, 2006). Importa enfatizar que a dor neuropática periférica é induzida não apenas por lesões focais diretas nos neurônios aferentes e seus ramos axonais, mas também indiretamente, por moléculas sintetizadas (dentre as quais as citocinas) por células gliais e imunológicas tanto no local, como na porção da raiz dorsal correspondente à lesão (KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009). Com base nestes dados, no que tange os mecanismos envolvidos na redução da hipersensibilidade induzida pela LEDT, o presente estudo investigou o papel das citocinas anti e pró-inflamatórias no nervo ciático e na medula dos camundongos após a lesão por ENC.

Em conformidade com os dados da literatura, nossos resultados demonstram que o modelo de ENC promoveu aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , tanto na medula espinal como no nervo ciático dos animais do grupo controle, em comparação com o grupo sham, sem entretanto modificar significativamente os níveis de IL-10 (Figura 23). Primeiramente, com relação à avaliação no local da lesão, destaca-se que a LEDT no grupo local diminuiu os níveis de TNF- $\alpha$  no nervo ciático (Figura 23 D). Tem sido demonstrado que após o ENC, vários tipos de células são ativadas e recrutadas para o local da lesão, dentre as quais mastócitos, macrófagos, fibroblastos, neutrófilos e células de Schwann. Estas células liberam citocinas pró-inflamatórias, juntamente com outros mediadores inflamatórios, tais como quimiocinas, bradicinina e prostaglandinas (SCHOLZ; WOOLF, 2007) que contribuem não apenas para a manutenção da inflamação, mas também para o desenvolvimento da dor (KULMATYCKI; JAMALI, 2007). Resultados similares foram obtidos por Xavier et al. (2010) que observaram que a LEDT foi capaz de reduzir a expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no local da tendinite experimental induzida no tendão calcâneo em ratos.

Adicionalmente, nossos resultados demonstram que a LEDT diminuiu os níveis de TNF- $\alpha$  (grupos local e distal) e IL-1 $\beta$  (grupo distal) na medula espinal dos animais submetidos ao ENC (Figura 23 A, C). No sistema nervoso central (SNC) o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias na iniciação e manutenção da dor neuropática é um fato bem estabelecido. Além disso, diversas citocinas, como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) apresentam níveis aumentadas no corno dorsal após lesão nervosa, contribuindo para a dor neuropática induzida pela lesão, possivelmente alterando a transmissão sináptica no SNC, inclusive na medula espinal (INOUE, 2006; GUO et al., 2007). Juntos, estes dados indicam que o efeito da LEDT na redução da hipersensibilidade aqui apresentado pode ser, pelo menos em parte, devido a uma diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tanto no local do esmagamento (nervo ciático), bem como na medula espinal.

Por fim, em relação ao possível efeito regenerativo da LEDT, os dados aqui apresentados demonstram que a irradiação crônica diária com LEDT (950 nm, 2,5 J, por 15 dias), não foi capaz de acelerar a recuperação funcional, expressa pelos índices estático e funcional do ciático (Figura 19 A-B), nem tampouco estimular a regeneração nervosa, como demonstrado na análise morfológica (Figura 20 A-D). Além disso, a LEDT não impediu a perda de massa muscular do sóleo e gastrocnêmio induzida pelo ENC (Figura 21). É importante ressaltar que

os dados aqui apresentados diferem dos obtidos com a regeneração do tendão calcâneo em ratos (BASTOS et al., 2009; CASALECHI et al., 2009). Estes resultados aparentemente contraditórios do efeito regenerativo da LEDT são provavelmente devido às diferenças inerentes do tecido-alvo (tendão vs. nervo), bem como às diferenças nos parâmetros da LEDT utilizados nesses estudos, especialmente nas fluências de 6 a 20J/cm<sup>2</sup> que são muito mais intensas do que os 2,5 J/cm<sup>2</sup> utilizados em nosso estudo.

Em conjunto, os resultados do presente estudo demonstram, pela primeira vez, que a LEDT (950 nm, a 80 mW/cm<sup>2</sup>, 2,5 J, a cada 24 horas durante 15 dias), quando irradiada em ambos os sítios, local e distal, reduziu a hipersensibilidade mecânica induzida pelo modelo de ENC em camundongos. Por outro lado, apenas no grupo distal a LEDT foi capaz de inibir a hipersensibilidade ao frio induzida pelo procedimento cirúrgico. Além disso, a LEDT, irradiada no sítio distal, diminuiu os níveis de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  na medula espinal; e no grupo local, diminuiu os níveis de TNF- $\alpha$  na medula espinal e no nervo ciático após o ENC. Por último, a LEDT não foi capaz de acelerar a recuperação da função motora, nem estimular a regeneração nervosa após lesão por ENC.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no presente estudo fornecem evidências de que a LEDT (950 nm, a 80 mW/cm<sup>2</sup>, 2,5 J, a cada 24 horas durante 15 dias) é capaz de reduzir a hipersensibilidade mecânica, bem como, após uma série de aplicações diárias, a hipersensibilidade térmica ao frio, em camundongos submetidos ao modelo do esmagamento do nervo ciático.

Além disso, este estudo demonstrou que a LEDT, de maneira seletiva e de acordo com o sítio irradiado, diminuiu os níveis de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$ , tanto na medula espinal como no nervo ciático dos animais submetidos ao ENC. Tais resultados sugerem que a redução dos níveis destas citocinas pró-inflamatórias, pode explicar, ao menos em parte, o efeito de redução da hipersensibilidade induzido pela LEDT, uma vez que estes mediadores contribuem não só para a manutenção da inflamação, mas também para o desenvolvimento da dor neuropática.

A LEDT, nos parâmetros de irradiação e dose aqui utilizados, não foi capaz de acelerar a recuperação da função motora, nem estimular a regeneração nervosa após a lesão por ENC. Tais resultados não devem ser tomados como definitivos, haja visto que a LEDT demonstrou potencial reparador ao acelerar a regeneração do tendão calcâneo em ratos.

Finalmente, conclui-se que novas pesquisas precisam ser conduzidas a fim de se confirmar os efeitos da LEDT no tratamento de neuropatias periféricas, bem como, no intuito de desvendar os mecanismos neurofisiológicos induzidos pela irradiação fotônica de baixa intensidade. Tais pesquisas poderão contribuir para o desenvolvimento e aceitação da LEDT como forma de terapia não invasiva e de baixo custo que possa complementar o tratamento das NPs e da dor neuropática associada.



## REFERÊNCIAS

ALLAIS, G. et al. Non-pharmacological approaches to chronic headaches: transcutaneous electrical nerve stimulation, lasertherapy and acupuncture in transformed migraine treatment. **Neurol Sci**, v. 24 Suppl 2, p. S138-42, mai. 2003.

ATTAL, N. et al. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. **Eur J Neurol**, v. 17, n. 9, p. 1113-e88, set. 2010.

AVILA-PEÑA, D. et al. Antinociceptive activity of *Syzygium jambos* leaves extract on rats. **J Ethnopharmacol**, v. 112, n. 2, p. 380-5, jun. 2007.

BAPTISTA, A. F. et al. A new approach to assess function after sciatic nerve lesion in the mouse - adaptation of the sciatic static index. **J Neurosci Methods**, v. 161, n. 2, p. 259-64, abr. 15 2007.

BAROLET, D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. **Semin Cutan Med Surg**, v. 27, n. 4, p. 227-38, dez. 2008.

BARON, R. Neuropathic pain: a clinical perspective. **Handb Exp Pharmacol**, n. 194, p. 3-30, 2009.

BASFORD, J. R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers Surg Med**, v. 16, n. 4, p. 331-42, 1995.

BASTOS, J. L. N. et al. Comparative Study of Laser and LED Systems of Low Intensity Applied to Tendon Healing. **Laser Physics**, v. Vol. 19, n. No. 9, p. 1925–1931, 2009.

BAXTER, D. **Laserterapia de baixa intensidade**. In: KITCHEN, S. (Ed.). *Eletroterapia: prática baseada em evidências*. São Paulo: Manole, 2003.

BAXTER, D. **Therapeutic lasers: Theory and practice**. London: Churchill Livingstone, 1995.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87-107, abr. 1988.

BESTER, H. et al. Changes in tactile stimuli-induced behavior and c-Fos expression in the superficial dorsal horn and in parabrachial nuclei after sciatic nerve crush. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 428, n. 1, p. 45-61. 2000.

BOCCABELLA, A. V. et al. Influence of hormones on recovery of electrical activity of crushed sciatic nerves in hypophysectomized rats. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 117, p. 800-3, dez. 1964.

BOUHASSIRA, D. et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. **Pain**, v. 136, n. 3, p. 380-387, jun. 2008

BRIDGE, P.M. et al. Nerve crush injuries - a model for axonotmesis. **Experimental Neurology**. v. 127, n. 2, p. 284-290. 1994.

CARGNIN-FERREIRA, E.; SARASQUETE, C. **Histofisiología de Moluscos Bivalvos Marinos**. Madrid: CSIC, 2008.

CASALECHI, H. L. et al. The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. **Lasers Med Sci**, v. 24, n. 4, p. 659-65, jul. 2009.

CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**, v. 53, n. 1, p. 55-63, jul. 1994.

CODERRE, T. J. et al. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. **Pain**, v. 52, n. 3, p. 259-85, mar. 1993.

COLEMAN, M. P. et al. An 85-kb tandem triplication in the slow Wallerian degeneration (Wlds) mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 17, p. 9985-90, ago. 1998.

CORONEL, M. F. et al. Oligonucleotide IMT504 reduces neuropathic pain after peripheral nerve injury. **Neurosci Lett**, v. 444, n. 1, p. 69-73, out. 2008.

COSTA, J. M. et al. Tratamiento de 15 casos de dolor crónico con un equipo de fotopuntura por diodos emisores de luz roja (617 nm). **Revista Internacional de Acupuntura**, v. 2 n. 1, jan. 2008.

de MEDINACELI, L. et al. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Experimental Neurology**, v. 77, n. 3, p. 634-643, 1982.

DECOSTERD, I. et al. Progressive tactile hypersensitivity after a peripheral nerve crush: non-noxious mechanical stimulus-induced neuropathic pain. **Pain**, v. 100, n. 1-2, p. 155-62, nov. 2002.

DECOSTERD, I.; WOOLF, C. J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**, v. 87, n. 2, p. 149-58, ago. 2000.

DESMET, K. D. et al. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 2, p. 121-8, abr. 2006.

DIJKSTRA, J. R. et al. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. **J Neurosci Methods**, v. 96, n. 2, p. 89-96, mar. 2000.

DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 20, p. 441-62, 1980.

DRAKE R, V. A., ADAM MITCHELL A. **Gray's Anatomy for Students**. New York: Churchill Livingstone, 2004.

DUARTE DA SILVA, M. et al. Involvement of Interleukin-10 in the Anti-inflammatory Effect of Sanyinjiao (SP6) Acupuncture in a Mouse Model of Peritonitis. **eCAM**, p. neq036, abr. 2010.

DWORKIN, R. H. et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Arch Neurol**, v. 60, n. 11, p. 1524-34, nov. 2003.

EELLS, J. T. et al. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy.

**Mitochondrion**, v. 4, n. 5-6, p. 559-67, set. 2004.

ENGLAND, J.D.; ASBURY, A.K. **Peripheral neuropathy**. *Lancet*, v. 26, n. 363, p. 2151-2161, 2004.

ENWEMEKA, S. Light is Light. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 2, p. 159-160, 2005.

\_\_\_\_\_. Standard parameters in laser phototherapy. **Photomed Laser Surg**, v. 26, n. 5, p. 411, out. 2008.

\_\_\_\_\_. Intricacies of dose in laser phototherapy for tissue repair and pain relief. **Photomed Laser Surg**, v. 27, n. 3, p. 387-93, Jun 2009.

ESNOUF, A. et al. Depth of penetration of an 850nm wavelength low level laser in human skin. **Acupunct Electrother Res**, v. 32, n. 1-2, p. 81-6, 2007.

FINNERUP, N. B. et al. Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. **Pain**, v. 118, n. 3, p. 289-305, dez. 5 2005.

FINNERUP, N. B.; JENSEN, T. S. Spinal cord injury pain--mechanisms and treatment. **Eur J Neurol**, v. 11, n. 2, p. 73-82, fev. 2004.

GEUNA, S. et al. Chapter 3: Histology of the peripheral nerve and changes occurring during during nerve regeneration. **Int Rev Neurobiol**, v. 87, p. 27-46, 2009.

GRECO, M. et al. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 163, n. 3, p. 1428-34, set. 1989.

GUO, W. et al. Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. **J Neurosci**, v. 27, n. 22, p. 6006-18, mai. 30 2007.

HORI, K. et al. Upregulations of P2X(3) and ASIC3 involve in hyperalgesia induced by cisplatin administration in rats. **Pain**, v. 149, n. 2, p. 393-405, mai. 2010.

INOUE, K. The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release. **Pharmacol Ther**, v. 109, n. 1-2, p. 210-26, jan. 2006.

INSERRA, M. M. et al. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. **Microsurgery**, v. 18, n. 2, p. 119-24, 1998.

IRVING, G.A. Contemporary assessment and management of neuropathic pain. **Neurology**, v. 64, n.12, p. 21-27, jun. 2005.

KAPLAN, S. et al. Chapter 2: Development of the peripheral nerve. **Int Rev Neurobiol**, v. 87, p. 9-26, 2009.

KARU, T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE J Quantum electronics**, v. 23, n. 10, p. 1703-1722, 1987.

\_\_\_\_\_. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys**, v. 56, n. 5, p. 691-704, mai. 1989.

\_\_\_\_\_. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B**, v. 49, n. 1, p. 1-17, Mar 1999.

KEHL, L. J. et al. A new animal model for assessing mechanisms and management of muscle hyperalgesia. **Pain**, v. 85, n. 3, p. 333-43, abr. 2000.

KEMPF, D. et al. Laser needle acupuncture in women with dysmenorrhoea: a randomised controlled double blind pilot trial. **Forsch Komplementmed**, v. 16, n. 1, p. 6-12, fev. 2009.

KIERNAN, J. A. **BARR'S The Human Nervous System: An anatomical viewpoint**. London: Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

KIERNAN, J. A. **Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice**. London: Butterworth-Heinemann, 2004.

KIM, S. H.; CHUNG, J. M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, v. 50, n. 3, p. 355-63, set. 1992.

KLUSAKOVA, I.; DUBOVY, P. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries - an anatomical perspective. **Ann Anat**, v. 191, n. 3, p. 248-59, jun. 2009.

KOLAROVA, H. et al. Penetration of the laser light into the skin in vitro. **Lasers Surg Med**, v. 24, n. 3, p. 231-5, 1999.

KOTINEN, V.K.; MEERT, T.F. **Vocalization Responses After Spinal Administration of Bicuculline or Strychnine in Rats.** Neuromodulation: Technology at the Neural Interface, V.5, n.4, p. 221-230, 2003.

KULMATYCKI, K. M.; JAMALI, F. Drug disease interactions: role of inflammatory mediators in pain and variability in analgesic drug response. **J Pharm Pharm Sci**, v. 10, n. 4, p. 554-66, 2007.

LETOKHOV, V. S. Effects of transient local heating of spatially and spectrally heterogeneous tissue by short laser pulses. **Nuovo Cimento**, v. 13, n. 7, p. 939-948, 1991.

LI, L. et al. Effect of lumbar 5 ventral root transection on pain behaviors: a novel rat model for neuropathic pain without axotomy of primary sensory neurons. **Exp Neurol**, v. 175, n. 1, p. 23-34, mai. 2002.

LIMANSKY, Y. P. et al. Suppression of pain by exposure of acupuncture points to polarized light. **Pain Res Manag**, v. 11, n. 1, p. 49-57, 2006.

LIU, C. Z. et al. Immediate Analgesia Effect of Single Point Acupuncture in Primary Dysmenorrhea: A Randomized Controlled Trial. **Pain Med**, dez. 2010.

LOBKO, V. V. et al. Is the coherence of low-intensity laser light essential for its effect on biological objects?. **Biofizika**, v. 30, n. 2, p. 366-71, abr. 1985.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, jul. 2008.

LOMBARD, M. C. et al. Deafferentation hypersensitivity in the rat after dorsal rhizotomy: a possible animal model of chronic pain. **Pain**, v. 6, n. 2, p. 163-74, abr. 1979.

LOW, J. R., A. **Laserterapia**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2001.

MACKINNON, S.E. et al. Histologic assessment of the nerve regeneration in the rat. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 75, n. 3, p. 384-388. 1985.

MARIEB, E. N.; HOEHN, K. **Human anatomy and physiology**. 7.ed. NEW YORK: Pearson Education, Inc., 2006.

MCMAHON, S. K., M. **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. 5. ed. London: Churchill Livingstone, 2006.

MEINHARDT, M. et al. Wavelength-dependent penetration depths of ultraviolet radiation in human skin. **J Biomed Opt**, v. 13, n. 4, p. 44-60, jul. 2008.

MESTER, E. et al. The effect of laser beams on the growth of hair in mice. **Radiobiol Radiother (Berl)**, v. 9, n. 5, p. 621-6, 1968.

\_\_\_\_\_. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg Med**, v. 5, n. 1, p. 31-9, 1985.

MIZGERD, J. P. et al. Early response cytokines and innate immunity: essential roles for TNF receptor 1 and type I IL-1 receptor during *Escherichia coli* pneumonia in mice. **J Immunol**, v. 166, n. 6, p. 4042-8, mar. 2001.

NAIK, A. K. et al. GABAA receptor modulation in dorsal root ganglia in vivo affects chronic pain after nerve injury. **Neuroscience**, v. 154, n. 4, p. 1539-53, jul. 2008.

NAVARRO X. et al. A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. **Progress in Neurobiology**. v. 82, n. 4, p. 163-201, 2007.

NICHOLLS, D.; ROSSITER, R. J. Metabolism of lipids of peripheral nerve regeneration after crush. **J Neurochem**, v. 11, p. 813-8, nov. 1964.

NIEDERBERGER, E. et al. Update on the pathobiology of neuropathic pain. **Expert Rev Proteomics**, v. 5, n. 6, p. 799-818, dez. 2008.

NIEMZ, M. H. **Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications**. 3rd. ed. New York: Springer, 2007.

NUSSBAUM E; BAXTER G, A. L. L. A review of laser technology and light-tissue interactions as a background to therapeutic applications of low intensity lasers and other light sources. **Phys Ther Rev**, v. 8, p. 31-44, 2003.

O'KANE, S. et al. Low intensity laser irradiation inhibits tritiated thymidine incorporation in the hemopoietic cell lines HL-60 and U937. **Lasers Surg Med**, v. 14, n. 1, p. 34-9, 1994.

O'REILLY, B. A. et al. Transdermal posterior tibial nerve laser therapy is not effective in women with interstitial cystitis. **J Urol**, v. 172, n. 5, p. 1880-3, nov. 2004.

PARKER, J. P., PM. **The patient's sourcebook on peripheral neuropathy**. San Diego: ICON Group International, Inc., 2002.

PONTINEN, P. J. et al. Comparative effects of exposure to different light sources (He-Ne laser, InGaAl diode laser, a specific type of noncoherent LED) on skin blood flow for the head. **Acupunct Electrother Res**, v. 21, n. 2, p. 105-18, abr. 1996.

REDDY, G. K. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. **J Clin Laser Med Surg**, v. 22, n. 2, p. 141-50, abr. 2004.

RODRIGUES, A. L. et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci**, v. 70, n. 12, p. 1347-58, fev. 8 2002.

RODRIGUEZ, F. J. E. A. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. **Drug Discovery Today Disease Model**, v. 1, n. 1, p. 177-185, 2004.

ROELANDTS, R. The history of phototherapy: something new under the sun? **J Am Acad Dermatol**, v. 46, n. 6, p. 926-30, jun. 2002.

SAADE, N. E.; JABBUR, S. J. Nociceptive behavior in animal models for peripheral neuropathy: spinal and supraspinal mechanisms. **Prog Neurobiol**, v. 86, n. 1, p. 22-47, set. 2008.

SCHINDL, A. et al. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. **Br J Dermatol**, v. 148, n. 2, p. 334-6, fev. 2003.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 11, p. 1361-8, nov. 2007.

SCHUBERT, E. **Light-Emitting Diodes**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.

SELTZER, Z. et al. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, n. 2, p. 205-18, nov. 1990.

SKINNER, S. M. et al. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. **Aust Dent J**, v. 41, n. 3, p. 188-92, jun. 1996.

SOMMER, C.; SCHAFERS, M. Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed Wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. **Brain Res**, v. 784, n. 1-2, p. 154-62, fev. 1998.

SORKIN, L. S.; YAKSH, T. L. Behavioral models of pain states evoked by physical injury to the peripheral nerve. **Neurotherapeutics**, v. 6, n. 4, p. 609-19, out. 2009.

SUAREZ-ROCA, H. et al. Stress-induced muscle and cutaneous hyperalgesia: differential effect of milnacipran. **Physiol Behav**, v. 88, n. 1-2, p. 82-7, jun. 2006.

SUSHKO, B. S. et al. Action of the red and infrared electromagnetic waves of light-emitting diodes on the behavioral manifestation of somatic pain. **Fiziol Zh**, v. 53, n. 3, p. 51-60, 2007.

TABO, E. et al. Behavioral manifestations of neuropathic pain and mechanical allodynia, and changes in spinal dorsal horn neurons, following L4-L6 dorsal root constriction in rats. **Pain**, v. 80, n. 3, p. 503-20, abr. 1999.

TAMAROVA, Z. A. et al. Antinociceptive effects of color polarized light in animal with formalin test. **Fiziol Zh**, v. 55, n. 3, p. 81-93, 2009.

TIPLER, A. P. **Física: eletricidade, magnetismo, ótica**. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

TÚNER, J. H., L. **The laser therapy handbook**. Tallinn: Prima Book, 2004.

VACCA, R. A. et al. Activation of mitochondrial DNA replication by He-Ne laser irradiation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 195, n. 2, p. 704-9, set. 1993.

\_\_\_\_\_. Increase of both transcription and translation activities following separate irradiation of the in vitro system components with He-Ne laser. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 203, n. 2, p. 991-7, set. 1994.

VALLAT, J. M.; MAGY, L. **Neuropathies périphériques: généralités**. EMC-Neurologie. v. 2, p. 175- 181, 2005.

VAN DE GRAAFF, K. **Van De Graaff Human Anatomy**. 6. ed. Toronto: McGraw-Hill Science, 2001.

VINCK, E. M. et al. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers Med Sci**, v. 18, n. 2, p. 95-9, 2003.

\_\_\_\_\_. Evidence of changes in sural nerve conduction mediated by light emitting diode irradiation. **Lasers Med Sci**, v. 20, n. 1, p. 35-40, 2005.

\_\_\_\_\_. Pain reduction by infrared light-emitting diode irradiation: a pilot study on experimentally induced delayed-onset muscle soreness in humans. **Lasers Med Sci**, v. 21, n. 1, p. 11-8, abr. 2006.

WALL, P. D. et al. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. **Pain**, v. 7, n. 2, p. 103-11, out. 1979.

WATKINS, L. R. et al. Spinal cord glia: new players in pain. **Pain**, v. 93, n. 3, p. 201-5, set. 2001.

WOOLF, C. J. Pain. **Neurobiol Dis**, v. 7, n. 5, p. 504-10, out. 2000.

\_\_\_\_\_. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. **Life Sci**, v. 74, n. 21, p. 2605-10, abr. 2004.

WU, H. C. et al. Effects of acupuncture on post-cesarean section pain. **Chin Med J (Engl)**, v. 122, n. 15, p. 1743-8, ago. 5 2009.

XAVIER, M. et al. Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats. **Lasers Surg Med**, v. 42, n. 6, p. 553-8, ago. 2010.

XIAO, H. S. et al. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 12, p. 8360-5, jun. 11 2002.

YU, W. et al. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. **Lasers Surg Med**, v. 20, n. 1, p. 56-63, 1997.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-10, jun. 1983.

ZOCHODNE, D. W. **Neurobiology of Peripheral Nerve Regeneration**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.