



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

WILLIANS FERNANDO VIEIRA

**EFEITOS DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LLLT) EM MODELO
DE NEUROPATIA DIABÉTICA EXPERIMENTAL**

EFFECTS OF LOW-LEVEL LASER THERAPY (LLLT) IN EXPERIMENTAL DIABETIC
NEUROPATHY

CAMPINAS

2020

WILLIANS FERNANDO VIEIRA

**EFEITOS DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LLLT) EM MODELO
DE NEUROPATIA DIABÉTICA EXPERIMENTAL**

**EFFECTS OF LOW-LEVEL LASER THERAPY (LLLT) IN EXPERIMENTAL DIABETIC
NEUROPATHY**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, como
parte dos requisitos exigidos para obtenção
do título de Doutor em Biologia Funcional e
Molecular, área de Fisiologia.*

*Thesis presented to the Institute of Biology of
the University of Campinas in partial
fulfillment of the requirements for the degree
of PhD in Functional and Molecular Biology,
area of Physiology.*

Orientador: Prof. Dr. CARLOS AMILCAR PARADA

Co-orientador: Prof. Dr. HELDER JOSE CERAGIOLI

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE
À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELO ALUNO WILLIANS FERNANDO
VIEIRA, ORIENTADO PELO PROF. DR.
CARLOS AMILCAR PARADA E CO-
ORIENTADO PELO PROF. DR. HELDER
JOSE CERAGIOLI.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

V673e Vieira, Willians Fernando, 1989-
Efeitos da terapia laser de baixa intensidade (LLLT) em modelo de neuropatia diabética experimental / Willians Fernando Vieira. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Carlos Amilcar Parada.
Coorientador: Helder José Ceragioli.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Neuropatias diabéticas. 2. Modulação da dor. 3. Terapia com luz de baixa intensidade. 4. Análise da marcha. 5. Espectroscopia Raman. I. Parada, Carlos Amilcar, 1960-. II. Ceragioli, Helder José. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of low-level laser therapy (LLLT) in experimental diabetic neuropathy

Palavras-chave em inglês:

Diabetic neuropathies

Pain modulation

Low-level light therapy

Gait analysis

Raman spectroscopy

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carlos Amilcar Parada [Orientador]

Gisele Picolo

Rodrigo Antunes de Vasconcelos

Carmen Veríssima Ferreira Halder

Marucia Chacur

Data de defesa: 28-02-2020

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3022-7997>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6797565400234482>

Campinas, 28/02/2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

Profa. Dra. Gisele Picolo

Prof. Dr. Rodrigo Antunes de Vasconcelos

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira Halder

Profa. Dra. Marucia Chacur

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata da Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

que por uma vida de dedicação,
amor incondicional, coragem e trabalho,
possibilitaram a seus filhos a oportunidade
de realizar sonhos.



AGRADECIMENTOS

Das Utopias

“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
a presença distante das estrelas!”

Mario Quintana, Espelho Mágico. Porto Alegre: Editora Globo. 1951.

À minha família, que sempre me serviu de base, me apoiou nas minhas escolhas e que acreditou em mim. Aos meus pais José e Edna, vocês são os grandes mentores de tudo isso. Agradeço à Deus por ter me escolhido para ser filho de vocês, e que, apesar de uma vida simples, nunca colocaram obstáculos frente aos meus objetivos e minhas vontades. Vocês me proporcionaram as melhores condições de vida, de amor, de apoio e de compreensão. À minha irmã, Patrícia, você também faz parte disso. Aos meus avós Álvaro Belizário Vieira (*in memoriam*) e Amélia Medeiros da Silva (*in memoriam*), estou com vocês em pensamento e sinto o amor de vocês. Amo vocês!

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), minha casa nos últimos 9 anos, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, ao Departamento de Biologia Estrutural e Funcional e ao Instituto de Biologia, por toda infraestrutura oferecida para a realização desse trabalho e por todas as oportunidades que surgiram a partir dele.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço, especialmente, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho de doutorado (Processo n. 2015/12673-5) e, também, pela oportunidade da realização de estágio BEPE/FAPESP (Processo n. 2018/05108-8) na *École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne* (EMSE), Gardanne, França, cujos resultados agregaram de maneira significativa à minha tese de doutorado.



Ao meu orientador, Professor Dr. Carlos Amilcar Parada, pelo aceite em me orientar após o falecimento do meu então orientador, Professor Dr. Vitor Baranauskas (*in memoriam*). Agradeço por todo espaço que me foi dado, não somente o físico, mas o espaço para o pensamento crítico, a liberdade de expressão e de criação, e por me permitir ir além. Sou imensamente grato.

Aos técnicos de laboratório, César Bissoto e Catarine Massucato Nishijima. Nada teria sido feito se não fosse a ajuda de vocês. Ao Césinha, pelo trabalho de excelência em bioterismo, especialmente pela atenção com os meus ratos diabéticos, que demandaram o dobro de cuidados. À Cat, sem palavras para descrever toda ajuda, desde os cálculos das soluções, o delineamento dos experimentos, especialmente para a cultura do GRD, ao cálcio!!! Ah, quanto trabalho nos deu esse cálcio! Mas deu certo, graças, principalmente, à sua disposição, sua responsabilidade, e por sempre estar a postos para me ajudar em tudo. Muito obrigado!

Aos meus colegas de laboratório, os de ontem e os de hoje, especialmente àqueles que colaboraram com conhecimento e habilidades indispensáveis à execução deste trabalho, e aos que se tornaram meus melhores amigos, cuja vida extra-laboratório eu pude compartilhar. Não tenho palavras para agradecer a vocês por tudo! Fer, Sil, Gal, Ivanzito, Kikinho, Majú, Alexandra, Kauê, Silviara, Felipão, Tutu, Gilson, Júlia, Anna Lethícia, Nathália, Amanda, Maria, Juliana, Felipinho, Garrafinha, Lilian e Elayne.

Aos *smalls*, vocês são as melhores pessoas que eu poderia ter encontrado nessa jornada, eu sentirei muita falta do convívio diário com vocês! Levarei um pouquinho de cada um comigo. Eu prometo aparecer sempre, para que possamos sentar e fofocar, afinal “*Great minds discuss ideas; average minds discuss events; small minds discuss people*” (Eleanor Roosevelt).

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABiC), na pessoa do Professor Dr. André Alexandre de Thomaz, do Departamento de Eletrônica Quântica do Instituto de Física “Gleb Wataghin” (IFGW) da UNICAMP. Agradeço pela disponibilidade do microscópio confocal e pelas discussões técnico-científicas que ajudaram a nortear parte dos meus experimentos. Também agradeço aos funcionários do Laboratório Multusuários (LAMULT) do IFGW, em especial à supervisora Dra. Rosane Palissari e ao físico Eduardo Favarão Gemis, por todo suporte técnico durante a aquisição dos espectros Raman.



Aos membros da minha Banca de Qualificação, Professor Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Professora Dra. Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio e Doutora Juliana Maia Teixeira, obrigado pelas preciosas sugestões que melhoraram imensamente a qualidade de minha, agora, Tese de Doutorado. À Comissão Examinadora da minha Defesa de Doutorado, Professor Dr. Carlos Amilcar Parada (Laboratório de Estudos da Dor, LEd/IB/UNICAMP), Profa. Dra. Gisele Picolo (Instituto Butantan), Prof. Dr. Rodrigo Antunes de Vasconcelos (Instituto Wilson Mello e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, FMRP-USP), Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira Halder (Instituto de Biologia, IB/UNICAMP) e Profa. Dra. Marucia Chacur (Instituto de Ciências Biomédicas, ICB/USP). Obrigado por toda contribuição técnico-científica, todo respeito e carinho e por compartilharem comigo um momento tão especial da minha formação e carreira. Espero encontrarmo-nos num futuro breve para um vinho, afinal de contas, « *une journée sans vin, c'est comme une journée sans soleil* » (*proverbe provençal*).

Always

« Les jours, les mois, les larmes qui coulent encore
Ils partent, s'envolent les morceaux de mon cœur
Ne reste que les remords
Et un jour, une lueur
Premier regard et plongeon amoureux
Dans le bleu de tes yeux... »

Gavin James (feat. Philippine).

I am very grateful to the *École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne* (EMSE), and the Department of Bioelectronics (BEL) at the Georges Charpak Campus, Gardanne, Provence-Alpes-Côte D'Azur, France. I would like to thank my host supervisor, Professor Rodney Phillip O'Connor, from Scotland, for his acceptance on hosting my project abroad, for all scientific support, and for the best barbecues and karaoke. I thank Denise Tannahill O'Connor, from Canada, for helping me with the DRG collections, general technical support, and friendship. I also thank Professor Christian GESTREAU for giving me the space needed for cell culture experiments and for keeping my Lewis rats at his vivarium, at the *Institut de Neurosciences des Systèmes, Aix-Marseille Université*, Marseille, France, and I thank Mr. Victor BERGE-LAVAL for technical issues on that. In addition, I thank Mrs.



Veronique VILLAREAL for all readiness to solve bureaucratic issues during my time as a visiting researcher in France.

Je remercie la France, les Français et les non-Français, qui m'y ont accueilli pendant un an. Je garde de bons souvenirs et laisse mon respect et mon affection pour cette nation fantastique ! Je remercie, en particulier, David MOREAU, pour toute son aide personnelle, technique et scientifique. Merci de m'avoir tant accueilli et de m'avoir aidé avec tous les détails de mon séjour à Gardanne. Tu as été indispensable pendant mon séjour en France. Merci beaucoup pour tout ! Je remercie également mes collègues français, Hermanus Johannes RUIGROK (Ian), from Bordeaux, et Marie LEFEVRE, from Lyon, d'avoir partagé les expériences en laboratoire, les conversations en cuisine, la bière au bar, les matchs de hockey... I would also like to thank my non-French labmates, who, like me, have set goals far from their country of origin. I thank Mary Donahue, from Alamogordo, New Mexico (USA), Atharva Pradhan, from Vadodara, Gujarat (India), Diana Navickaitė, from Klaipėda, Lithuania, and Janja Dermol-Černe, from Ljubljana, Slovenia. Vous étiez très spécial pour moi, je me suis senti accueilli et aimé. Je vous suis extrêmement reconnaissant et vous me manquez !

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho e àqueles que contribuíram para que eu me tornasse uma pessoa melhor.

Muito obrigado!

Thank you so much.

Merci beaucoup pour tout !



« Bien sûr, dit le renard. Tu n'es encore pour moi qu'un petit garçon tout semblable à cent mille petits garçons. Et je n'ai pas besoin de toi. Et tu n'as pas besoin de moi non plus. Je ne suis pour toi qu'un renard semblable à cent mille renards. Mais, si tu m'apprivoises, nous aurons besoin l'un de l'autre. Tu seras pour moi unique au monde. Je serai pour toi unique au monde. »



Le Petit Prince,
Antoine de Saint-Exupéry, 1943.



RESUMO

A neuropatia diabética periférica (NDP) acomete 60% dos pacientes diabéticos e é a causa mais comum de dor neuropática no mundo ocidental. A dor é o principal sintoma da NDP e há uma estreita correlação entre o desenvolvimento da NDP e o aumento de citocinas pró-inflamatórias nos gânglios das raízes dorsais (GRDs), que atuam como ativadoras de proteínas quinases (MAPKs), como as proteínas p38, ERK1/2 e c-Jun-N-terminal. Não há tratamento efetivo para a NDP, exceto o rigoroso controle da hiperglicemia. A Terapia Laser de Baixa Intensidade (do inglês “*Low-Level Laser Therapy*”, LLLT) é uma opção de tratamento para a NDP. Contudo, pouco se sabe sobre o mecanismo dos efeitos da LLLT na NDP. A partir disso, o objetivo deste estudo foi investigar os mecanismos do efeito anti-hiperalgésico da LLLT em ratos com NDP induzida por estreptozotocina (STZ). Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP), protocolos n. 3902-1 e n. 5337-1/2019. Ratos Lewis isogênicos, machos, 200-250 g, 4-8 semanas, receberam 5 doses de STZ, 1 dose por dia, durante 5 dias consecutivos (25 mg/kg/dia) ou veículo, tampão citrato de sódio 0,1 M. O diabetes tipo I foi determinado por glicemia ≥ 250 mg/dL em 48 h após a última injeção de STZ. Os animais foram submetidos aos testes de Randall-Selitto, von Frey eletrônico e CatWalk nos dias 0, 7, 14, 21, 24 e 28 após as injeções de STZ ou veículo. Ratos diabéticos hiperalgésicos foram submetidos à LLLT (AsGa, 904 nm; 2,03 J; 70 mW; 29 s) aplicada sobre a região dos GRDs L4-L5, entre os dias 21 e 28. No 28º dia, os ratos foram eutanasiados e os GRDs L4-L5 foram coletados para experimentos de ELISA, RT-qPCR, Western blot, imunofluorescência e espectroscopia Raman. Em paralelo, GRDs de ratos naïve foram usados para cultura primária de neurônios, os quais foram mantidos por 24 h em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e usados para análise da dinâmica de cálcio intracelular, potencial de membrana mitocondrial (MMP), potencial de membrana neuronal (NMP) por FluoVolt™, patch clamp *whole-cell* e ensaio de viabilidade celular por MTT. A LLLT foi capaz de reduzir a intensidade de hiperalgesia mecânica nos ratos com NDP e de restabelecer parâmetros espaciais da marcha, fortemente correlacionados à hiperalgesia. A LLLT levou a redução dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no GRD e da expressão de mRNAs para p38 MAPK. Na NDP, houve aumento da fosforilação da proteína p38 MAPK, parcialmente reduzida após a LLLT. Picos do espectro Raman dos GRDs L4-L5, alterados na NDP (2704 cm^{-1} ; 2850 cm^{-1} ; 2885 cm^{-1} ; 3160 cm^{-1}), retornaram à intensidade normal após a LLLT. Neurônios do GRD mantidos em meio hiperglicêmico e expostos à LLLT, apresentaram redução do influxo de cálcio e aumento do MMP, ligado à ativação dos complexos mitocondriais I e III. Não houve influência significativa da LLLT sobre o NMP. De maneira geral, a LLLT apresentou efeito benéfico no tratamento da NDP, pois foi capaz de atuar positivamente sobre as suas principais alterações comportamentais, celulares, moleculares e espectrais.

Palavras-chave: neuropatia diabética periférica; fotobiomodulação; LLLT; função motora dinâmica; espectroscopia Raman; MAPK.

ABSTRACT

Peripheral diabetic neuropathy (PDN) occurs in 60 % of the diabetic patients, and it is considered the most common cause for neuropathic pain in the western world. Pain is the most common symptom of PDN, and there is a strong correlation between the development of PDN and the increase in the concentration of proinflammatory cytokines and mitogen activated protein kinases (MAPKs), including p38, ERK1/2, and c-Jun-N-terminal proteins in the dorsal root ganglia (DRG). There is no efficient treatment for NDP, except the rigorous hyperglycemia control. Low-Level Laser Therapy (LLLT) could be an interesting option for the PDN treatment. However, there is little information about the influence of LLLT over the PDN. Based on that, the aim of this study was to investigate the anti-hyperalgesic effect mechanisms of LLLT applied in streptozotocin (STZ)-induced diabetic neuropathic rats. All the experiments were approved by the UNICAMP Ethics Committee (CEUA), protocols n. 3902-1 and 5337-1/2019. Male isogenic Lewis rats, 200-250 g, 4-8-week-old, received 5 low-doses of STZ, 1 dose per day, during 5 consecutive days (25 mg/kg/day), or vehicle, 0.1 M sodium buffer citrate. Type-1 diabetes was determined by the occurrence of glycemia ≥ 250 mg/dL at 48 h after the last STZ injection. Rats were submitted to Randall-Selitto, electronic von Frey, and CatWalk tests, at 0, 7, 14, 21, 24, and 28 days after the beginning of STZ or vehicle injections. Diabetic hyperalgesic rats were submitted to LLLT (GaAs, 904 nm; 2.03 J; 70 mW; 29 s), applied over the rats shaved skin at the dorsal region of L4-L5 DRG, bilaterally, between the 21st and the 28th days of the experimental protocol. At the 28th day, rats were euthanized and the L4-L5 DRG were collected and processed for ELISA, RT-qPCR, Western blot, immunofluorescence, and Raman spectroscopy analyses. In parallel, DRG from naïve rats were used for primary cell culture of afferent neurons, which were kept during 24 h under low- or high-glucose cell media, and used for calcium imaging, mitochondrial membrane potential (MMP), neuronal membrane potential (NMP) through FluoVolt™, patch clamp whole-cell and MTT cell viability assay. LLLT treatment was able to reduce the intensity of mechanical hyperalgesia in diabetic neuropathic rats, and to restore altered spatial gait parameters strongly correlated to hyperalgesia. LLLT treatment reduced the levels of DRG IL-1 β and TNF- α , and the p38 MAPK mRNA expression. PDN was accompanied by the p38 MAPK phosphorylation, which was partially reduced by LLLT. Altered peaks from DRG Raman spectra of diabetic neuropathic rats (2704 cm⁻¹; 2850 cm⁻¹; 2885 cm⁻¹; 3160 cm⁻¹) showed normal intensities after LLLT treatment. DRG neurons kept in hyperglycemic medium and exposed to LLLT, showed reduced calcium influx and increased MMP, related to mitochondrial complexes I and III. There was no significant influence over NMP. LLLT did not affect the cell viability of DRG neurons. In general, there were beneficial effects of LLLT in the treatment of PDN, once the therapy was able to act, positively, over behavioral, cellular, molecular, and spectral alterations.

Key words: peripheral diabetic neuropathy; photobiomodulation; LLLT; gait analysis; Raman spectroscopy; MAPK.

RÉSUMÉ

La neuropathie diabétique périphérique (NDP) affecte 60% des patients diabétiques. La douleur est le principal symptôme du NDP et il existe une corrélation étroite entre le développement du NDP et l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans les ganglions de la racine dorsale (GRDs), qui agissent comme activateurs de protéines kinases (MAPKs). Thérapie laser à faible intensité (de l'anglais "*Low-Level Laser Therapy*", LLLT) est une option de traitement pour le NDP. Cependant, on sait peu de choses sur le mécanisme des effets du LLLT sur le NDP. L'objectif de cette étude était d'étudier les mécanismes de l'effet anti-hyperalgésique du LLLT chez les rats atteints de NDP induit par la streptozotocine (STZ). Les expériences ont été approuvées par le Comité d'éthique pour l'utilisation des animaux (CEUA/UNICAMP), protocoles n. 3902-1 et n. 5337-1 / 2019. Des rats Lewis mâles isogéniques, 200-250 g, 4-8 semaines, ont reçu 5 doses de STZ, 1 dose par jour, pendant 5 jours consécutifs (25 mg / kg / jour) ou véhicule, tampon de citrate de sodium 0,1 M. Le diabète de type I a été déterminé par une glycémie ≥ 250 mg / dL dans les 48 heures suivant la dernière injection de STZ. Les animaux ont été soumis aux tests Randall-Selitto, von Frey électronique et CatWalk les jours 0, 7, 14, 21, 24 et 28 après les injections de STZ ou de véhicule. Des rats diabétiques hyperalgésiques ont été soumis au LLLT (AsGa, 904 nm; 2,03 J; 70 mW; 29 s) appliqué sur la région GRD L4-L5, entre les jours 21 et 28. Le 28ème jour, les rats ont été euthanasiés et les GRD L4-L5 ont été collectés pour des expériences ELISA, RT-qPCR, Western blot, immunofluorescence et spectroscopie Raman. En parallèle, des GRD de rats naïfs ont été utilisés pour la culture de neurones primaires, qui ont été maintenus pendant 24 h en milieu normoglycémique ou hyperglycémique et utilisés pour l'analyse de la dynamique intracellulaire du calcium, du potentiel de la membrane mitochondriale (MMP), du potentiel de la membrane neuronale (NMP), patch clamp et test de viabilité des cellules MTT. Le LLLT a pu réduire l'intensité de l'hyperalgésie mécanique chez les rats atteints de NDP et restaurer les paramètres spatiaux de la démarche, fortement corrélés à l'hyperalgésie. LLLT a conduit à une réduction des niveaux de TNF- α , IL-1 β et IL-6 dans le GRD et dans l'expression des RNAm pour p38 MAPK. Dans le NDP, il y a eu une augmentation de la phosphorylation de la protéine p38 MAPK, partiellement réduite après le LLLT. Les pics du spectre Raman des GRD L4-L5, modifiés en NDP, sont revenus à une intensité normale après LLLT. Les neurones GRD maintenus en milieu hyperglycémique et exposés au LLLT, ont montré une réduction de l'apport de calcium et une augmentation de la MMP. Il n'y avait aucune influence significative de LLLT sur NMP. En général, le LLLT a eu un effet bénéfique dans le traitement du NDP, car il a pu agir positivement sur ses principaux changements comportementaux, cellulaires, moléculaires et spectraux.

Mots-clés: neuropathie diabétique périphérique; photobiomodulation; LLLT; fonction moteur dynamique; spectroscopie Raman; MAPK.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Patogênese da neuropatia diabética periférica.	34
Figura 2	Mecanismo fotobiomodulador da LLLT: sinalização retrógrada pela mitocôndria.	39
Figura 3	Fotodissociação do óxido nítrico (NO) a partir do citocromo c oxidase (CCO).	41
Figura 4	LLLT aplicada à região dorsal L4-L5.	52
Figura 5	Sistema de fibra óptica COFS (<i>Customized Optical Fiber System</i>).	54
Figura 6	Desenvolvimento dos sinais clínicos do diabetes mellitus tipo I induzido por múltiplas doses de STZ.	75
Figura 7	Esquema representativo do protocolo experimental utilizado para estudo dos efeitos da LLLT durante o desenvolvimento da neuropatia diabética.	77
Figura 8	Efeito da LLLT sobre a hiperglicemia induzida por múltiplas doses de STZ durante o desenvolvimento da neuropatia diabética.	78
Figura 9	Efeito da LLLT sobre a massa corpórea dos animais durante o desenvolvimento da neuropatia diabética.	79
Figura 10	Efeitos das diferentes doses de energia da LLLT (2,03 J; 4,06 J; 8,12 J) durante o desenvolvimento da dor neuropática diabética, com base na hiperalgesia mecânica pelo teste de Randall-Selitto.	80
Figura 11	Escolha da dose total de energia de trabalho (em Joule), com base na maior eficiência em prevenir o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica em ratos diabéticos.	82
Figura 12	Esquema representativo do protocolo experimental utilizado para estudo dos efeitos anti-hiperalgésicos da LLLT após o desenvolvimento da neuropatia diabética.	84
Figura 13	Efeito anti-hiperalgésico da LLLT após o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica induzida por STZ.	85
Figura 14	Efeito da LLLT sobre a hiperglicemia induzida por múltiplas doses de STZ após o desenvolvimento da neuropatia diabética.	86
Figura 15	Efeito da LLLT sobre a massa corpórea dos animais após o desenvolvimento da neuropatia diabética.	87
Figura 16	Parâmetros gerais das corridas.	89

Figura 17	Imagem 2D capturada através da passarela de vidro do sistema CatWalk (<i>2D footprint intensities</i>) e gráficos representativos da intensidade.	90
Figura 18	Esquema 3D, representativo da intensidade das impressões das pegadas.	91
Figura 19	Parâmetros de intensidade relacionados às patas traseiras mostram-se alterados na neuropatia diabética periférica induzida por STZ.	92
Figura 20	Parâmetros espaço-temporais: Apoio (<i>Stand</i>) e Balanço (<i>Swing</i>).	93
Figura 21	Diagramas de tempo ilustrando o contato das patas.	93
Figura 22	Parâmetros espaciais da marcha.	94
Figura 23	Outros parâmetros da marcha.	96
Figura 24	Coeficiente de Correlação de Pearson (PCC): parâmetros de marcha (CatWalk XT) <i>versus</i> intensidade de hiperalgesia mecânica (von Frey eletrônico).	97
Figura 25	Padrão geral da impressão da pata traseira: imagem 2D capturada através da passarela de vidro do sistema CatWalk XT.	98
Figura 26	Efeito da LLLT sobre a Área Máxima de Contato (<i>Maximum Contact Area</i>) (cm ²).	99
Figura 27	Efeito da LLLT sobre a Área da Pegada (<i>Print Area</i>) (cm ²).	100
Figura 28	Efeito da LLLT sobre Comprimento da Pegada (<i>Stride Length</i>) (cm).	100
Figura 29	Efeito da LLLT sobre a concentração de TNF- α (pg/mL) nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos.	101
Figura 30	Efeito da LLLT sobre a concentração de IL-1 β (pg/mL) nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos.	102
Figura 31	Efeito da LLLT sobre a concentração de IL-6 (pg/mL) nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos.	103
Figura 32	Efeito da LLLT sobre a concentração de CINC-1 (pg/mL) nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos.	104
Figura 33	Efeito da LLLT sobre a concentração de IL-10 (pg/mL/mg) nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos.	105
Figura 34	Expressão relativa de p38 mRNA por RT-qPCR.	106
Figura 35	Expressão relativa de ERK1/2 mRNA por RT-qPCR.	107
Figura 36	Expressão relativa de JNK mRNA por RT-qPCR.	107
Figura 37	Deteção da MAPK ERK1/2 por Western blot.	109
Figura 38	Deteção de MAPK/ERK1/2 (p44 e p42) por Western blot.	110

Figura 39	Imunofluorescência dos GRDs L4-L5 para marcação da forma fosforilada de p38 (p-p38).	111
Figura 40	Imunofluorescência do GRDs L4-L5 para marcação da forma fosforilada de ERK1/2 (p-ERK1/2).	112
Figura 41	Imunofluorescência dos GRDs L4-L5 para marcação da forma fosforilada de JNK (p-JNK).	113
Figura 42	Espectroscopia Raman dos GRDs L4-L5.	114
Figura 43	Imagens representativas das fluorescências durante os incrementos da concentração de KCl no meio extracelular.	130
Figura 44	Dinâmica de cálcio intracelular: experimento <i>ex vivo</i> .	131
Figura 45	Dinâmica de cálcio intracelular (<i>ex vivo</i>): estudo populacional.	132
Figura 46	Imagens representativas da fluorescência relacionada ao $\Delta[Ca^{2+}]_i$ durante os incrementos da concentração de KCl no meio extracelular.	133
Figura 47	Dinâmica de cálcio intracelular: experimento <i>in vitro</i> .	134
Figura 48	Dinâmica de cálcio intracelular: diferenças com relação à intensidade do estímulo (KCl 15 ou 50 mM).	135
Figura 49	Dinâmica de cálcio intracelular (<i>in vitro</i>): estudo populacional.	136
Figura 50	Potencial de membrana mitocondrial (MMP) de neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT.	137
Figura 51	O efeito da LLLT no potencial de membrana mitocondrial (MMP) de neurônios do GRD depende parcialmente da ativação dos complexos mitocondriais I e III.	138
Figura 52	Potencial de membrana (FluoVolt™) de neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT.	140
Figura 53	<i>Setup</i> do experimento de Patch clamp <i>whole-cell</i> de neurônios do GRD em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT.	141
Figura 54	Testes da excitabilidade da membrana dos neurônios do GRD: reobase, potencial de repouso (RMP) e limiar de excitabilidade da membrana.	142
Figura 55	Potencial de membrana neuronal por patch clamp <i>whole-cell</i> de neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT.	143
Figura 56	Ensaio de viabilidade celular por MTT de neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT.	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros da LLLT para o estudo <i>in vivo</i> .	51
Tabela 2	Parâmetros do CatWalk XT.	55
Tabela 3	Sequência dos <i>primers</i> desenhados com auxílio da ferramenta " <i>Pick Primers</i> ", disponíveis no banco de dados NCBI que foram utilizados para a reação de RT-qPCR.	61
Tabela 4	Padrão de peso molecular.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
AGEs	<i>Advanced glycation end products</i>
ALSS	<i>Asymmetric least squares smoothing</i>
AM	<i>Acetoxymethyl</i>
AMA	Antimicina A
ANOVA	Análise de variância
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
AsGa	Arseneto de Gálio
ATP	Adenosina trifosfato
AVDs	Atividades de vida diária
BEL	Bioeletrônica
BEPE	Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BS	<i>Body speed</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCO	Citocromo c oxidase
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência de Animais de Laboratório
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CH	Carbono-hidrogênio
CINC-1	<i>Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1</i>
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COFS	<i>Customized optical fiber system</i>
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DEPC	<i>Diethyl pyrocarbonate</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido

DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNP	2,4-dinitrofenol
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMSE	<i>École des Mines de Saint-Étienne</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
GaAl	Gálio-Alumínio
GaAlAs	Arseneto de Gálio-Alumínio
GRD	Gânglio da raiz dorsal
GT	Genitália
GTP	Trifosfato de guanosina
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HeNe	Hélio-Neônio
HeNeAs	Arseneto de Hélio-Neônio
HEPES	<i>Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid</i>
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina 6
INFABiC	Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia Celular
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
L4-L5	Lombar 4 e 5
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LAMULT	Laboratório Multiusuários
LCIS	<i>Live cell imaging solution</i>
LDA	<i>Linear Discriminant Analysis</i>
Led	Laboratório de Estudos da Dor
LED	<i>Light emitting diode</i>
LEW	Lewis
LF	<i>Left frontlimb</i>
LH	<i>Left hindlimb</i>
LLLT	<i>Low-Level Laser Therapy</i>

MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MeSH	<i>Medical Subject Headings</i>
MMP	<i>Mitochondrial Membrane Potential</i>
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDP	Neuropatia diabética periférica
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NH	Nitrogênio-hidrogênio
NO	<i>Nitric Oxide</i>
OH	Oxigênio-hidrogênio
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase-1
PBMT	<i>Photobiomodulation Therapy</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	<i>Principal Component</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCC	<i>Pearson's Correlation Coefficient</i>
PDN	<i>Peripheral Diabetic Neuropathy</i>
PFA	Paraformaldeído
PKC	Proteína quinase C
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PNS	<i>Peripheral Nervous System</i>
PSP	<i>Pluronic surfactant polyols</i>
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RAS	<i>Run average speed</i>
RF	<i>Right frontlimb</i>
RH	<i>Right hindlimb</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
ROT	Rotenona
RT-qPCR	<i>Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SAPK	<i>Stress-activated protein kinase</i>

SCB	<i>Sodium Citrate Buffer</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
STZ	<i>Streptozotocina</i>
TBST	<i>Tris Buffered Saline with Tween 20</i>
T1D	<i>Type 1 diabetes</i>
T2D	<i>Type 2 diabetes</i>
TMB	<i>Tetramethyl benzidine</i>
TMRE	<i>Tetramethylrhodamine, ethyl ester</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
UNICAMP	<i>Universidade Estadual de Campinas</i>
UV	<i>Ultravioleta</i>
WALT	<i>World Association for Laser Therapy</i>
WB	<i>Western blot</i>

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Relação entre frequência (Hz) e comprimento de onda (m).	36
Equação 2	Energia do fóton (J) de acordo com a constante de <i>Planck</i> (h).	36
Equação 3	Menores comprimentos de onda (λ) da luz carregam fótons com maior energia.	37
Equação 4	Lei de <i>Snellius</i> .	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
1.1	Diabetes mellitus	31
1.2	Neuropatia diabética periférica (NDP)	32
1.3	Terapia laser de baixa intensidade (LLLT, do inglês “<i>Low-Level Laser Therapy</i>”)	36
1.3.1	<i>Luz</i>	36
1.3.2	<i>Interações da luz com os tecidos biológicos</i>	37
1.3.3	<i>Analgesia promovida pela LLLT</i>	41
2	JUSTIFICATIVA	44
3	OBJETIVOS	45
3.1	Objetivo geral	45
3.2	Objetivos específicos	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	Animais	47
4.3	Teste de pressão na pata: Randall-Selitto	49
4.4	Teste de pressão crescente: von Frey eletrônico	49
4.5	Terapia laser de baixa intensidade (“<i>Low-level laser therapy</i>”, LLLT)	50
4.5.1	<i>LLLT in vivo</i>	50
4.5.2	<i>LLLT in vitro</i>	52
4.5.2.1	<i>LLLT por meio do sistema de fibra óptica COFS (Customized Optical Fiber System)</i>	53
4.6	Análise da função motora dinâmica por meio do sistema CatWalk XT	54
4.7	Coleta dos gânglios das raízes dorsais (GRDs)	57
4.8	Homogeneização e extração de proteínas dos GRDs	58

4.9	Ensaio imuno-enzimático (ELISA) para medida de níveis de mediadores inflamatórios TNF-α, IL-1β, IL-6, CINC-1 e IL-10	58
4.10	Extração de RNA e síntese de cDNA a partir dos GRDs	59
4.11	Real time polymerase chain reaction (RT-qPCR)	60
4.12	Western blot para quantificação de MAPKs nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos submetidos à LLLT	62
4.13	Imunofluorescência para detecção de MAPKs nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos submetidos à LLLT	64
4.13.1	<i>Anticorpos utilizados</i>	65
4.14	Espectroscopia Raman dos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos hiperalgésicos submetidos ao tratamento com LLLT	65
4.15	Cultura primária de neurônios do GRD	66
4.16	Avaliação da dinâmica de cálcio intracelular (<i>long-term response</i>): experimentos <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i>	67
4.16.1	<i>Dinâmica de cálcio intracelular: experimento <i>ex vivo</i></i>	67
4.16.2	<i>Dinâmica de cálcio intracelular: experimento <i>in vitro</i></i>	68
4.17	Potencial de membrana mitocondrial (MMP) dos neurônios do GRD por TMRE (Tetramethylrhodamine, ethyl ester) (<i>fast-term response</i>)	69
4.18	Potencial de membrana dos neurônios do GRD por FluoVolt™ Membrane Potential Probe (<i>ultra fast-term response</i>)	70
4.19	Patch clamp <i>whole-cell</i> dos neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT	71
4.20	Ensaio de viabilidade celular por MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]}	72
4.21	Análises estatísticas	73
5	RESULTADOS	74
5.1	Eficácia da indução do diabetes tipo I por múltiplas doses de estreptozotocina (STZ)	74

5.2	Efeitos da LLLT sobre a hiperglicemia e a massa corpórea dos animais durante o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica induzida por STZ	76
5.2.1	<i>Hiperglicemia</i>	76
5.2.2	<i>Massa corpórea</i>	78
5.3	Efeito anti-hiperalgésico da LLLT durante o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica induzida por STZ	79
5.3.1	<i>Escolha da dose de energia total de trabalho: 2,03 J</i>	81
5.4	Efeito anti-hiperalgésico da LLLT após o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica induzida por STZ	83
5.5	Efeitos da LLLT sobre a hiperglicemia e a massa corpórea dos animais após o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica induzida por STZ	85
5.5.1	<i>Hiperglicemia</i>	85
5.5.2	<i>Massa corpórea</i>	86
5.6	Caracterização das alterações da função motora dinâmica e correlações com hiperalgesia mecânica em ratos diabéticos neuropáticos	88
5.6.1	<i>Parâmetros Gerais das corridas</i>	89
5.6.2	<i>Parâmetros de intensidade relacionados às patas traseiras (hindlimbs)</i>	90
5.6.3	<i>Parâmetros espaço-temporais relacionados às patas traseiras (hindlimbs)</i>	92
5.6.4	<i>Parâmetros espaciais relacionados às patas traseiras (hindlimbs)</i>	94
5.6.5	<i>Teste de Correlação de Pearson (PCC) e Regressão Linear (von Frey X CatWalk)</i>	96
5.7	Efeitos da LLLT sobre as alterações observadas na função motora dinâmica dos ratos diabéticos neuropáticos	98
5.8	Avaliação dos níveis de citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6, CINC-1 e IL-10 por ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos submetidos à LLLT	101
5.8.1	<i>TNF-α</i>	101
5.8.2	<i>IL-1β</i>	102
5.8.3	<i>IL-6</i>	103
5.8.4	<i>CINC-1</i>	103
5.8.5	<i>IL-10</i>	104
5.9	Real time polymerase chain reaction (RT-qPCR) para quantificação dos genes codificadores de MAPKs nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos submetidos à LLLT	105
5.9.1	<i>p38 mRNA</i>	106

5.9.2	<i>ERK1/2 e JNK mRNA</i>	107
5.10	Western blot para quantificação de MAPKs nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos submetidos à LLLT	108
5.11	Imunofluorescência para detecção de MAPKs nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos submetidos à LLLT	110
5.12	Espectroscopia Raman para caracterização dos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos submetidos à LLLT	114
5.12.1	<i>Raman spectroscopy of dorsal root ganglia from streptozotocin-induced diabetic neuropathic rats submitted to photobiomodulation therapy</i>	115
5.13	Avaliação da dinâmica de cálcio intracelular	130
5.13.1	<i>Experimento ex vivo: dinâmica intracelular de cálcio em neurônios dos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos submetidos à LLLT</i>	130
5.13.2	<i>Experimento in vitro: dinâmica de cálcio intracelular em cultura primária de neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT (long-term response)</i>	132
5.15	Efeitos da LLLT sobre o potencial de membrana mitocondrial (MMP) dos neurônios do GRD, por TMRE (Tetramethylrhodamine, ethyl ester) (<i>fast-term response</i>)	136
5.15.1	<i>O efeito da LLLT no potencial de membrana mitocondrial (MMP) de neurônios do GRD depende parcialmente da ativação dos complexos mitocondriais I e III</i>	138
5.16	Potencial de membrana neuronal por FluoVolt™ Membrane Potential Probe (<i>ultra fast-term response</i>) de neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT	139
5.17	Patch clamp <i>whole-cell</i> dos neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT	140
5.18	Ensaio de viabilidade celular por MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} de neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT	143
6	DISCUSSÃO	147
6.1	A indução do diabetes tipo I (T1D) por múltiplas doses de estreptozotocina (STZ)	147

6.2	Caracterização das alterações da função motora dinâmica na neuropatia diabética e efeitos da LLLT	148
6.3	Efeitos da LLLT na redução da hiperalgesia mecânica decorrente da neuropatia diabética periférica	151
6.4	Deteção de MAPKs nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos e efeitos da LLLT sobre a expressão destas proteínas	152
6.5	Caracterização dos GRDs L4-L5 de ratos neuropáticos diabéticos submetidos à LLLT por espectroscopia Raman	155
6.6	Efeitos da aplicação da LLLT <i>in vitro</i>	157
6.7	Considerações finais	160
7	CONCLUSÕES	162
	REFERÊNCIAS	163
	APÊNDICES	187
	Apêndice 1	188
	Apêndice 2	189
	Apêndice 3	190
	Apêndice 4	191
	Apêndice 5	192
	FAPESP INTERNATIONAL INTERNSHIP FELLOWSHIP FINAL REPORT (BEPE/FAPESP)	193
	Direct influence of low-level laser irradiation on neurons: an electrophysiological study to helping comprise analgesic effects of infrared light in diabetic neuropathy	194
	SUMMARY	195
	INTRODUCTION	197

Brief review of the literature	197
Previous results	198
GOALS	199
Specific goals	200
ACCOMPLISHED ACTIVITIES	200
MATERIALS AND METHODS	201
Ethics statement and animals	201
Immortalized cell cultures (U87, HT22, and NG108-15)	201
Dorsal root ganglia (DRG) primary cell culture	202
Photobiomodulation therapy (PBMT) through low-level laser irradiation (LLLT) and customized optical-fiber system	203
Mitochondrial membrane potential (MMP) through tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRE) fluorescence	205
Neuronal membrane potential (FluoVolt™ Membrane Potential Probe)	205
Whole-cell patch clamp recordings of DRG afferent neurons	206
Statistical analysis	207
RESULTS AND DISCUSSION	207
Pilot study on mitochondrial membrane potential (MMP) with U87, HT22, NG108-15 cells, and DRG afferent neurons exposed to PBMT (904 nm) under low- or high-glucose conditions, using TMRE (Tetramethylrhodamine ethyl ester) fluorescence	207
Optimized mitochondrial membrane potential (MMP) experiments with DRG afferent neurons exposed to PBMT (904 nm) under low- or high-glucose conditions, based on TMRE (Tetramethylrhodamine ethyl ester) fluorescence	215

<i>PBMT effects on mitochondrial membrane potential (MMP) depend on the activation of mitochondrial complexes I and III</i>	217
Neuronal membrane potential (FluoVolt™) of DRG afferent neurons in low- or high-glucose and exposed to PBMT	219
Patch clamp of DRG afferent neurons exposed to PBMT	221
CONCLUSIONS	224
ACKNOWLEDGEMENTS	224
REFERENCES	225
FINAL REPORT APPENDIX	231
Appendix 6.1	231
Appendix 6.2	233
Apêndice 7	234
Apêndice 8	256
ANEXOS	283
Anexo 1	284
Anexo 2	285
Anexo 3	286

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellitus

O Diabetes mellitus é uma doença crônica que ocorre quando o organismo não é capaz de produzir insulina (diabetes tipo I; T1D) ou não é capaz de usar efetivamente a que é produzida (diabetes tipo II; T2D) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2020). A insulina é um hormônio polipeptídico produzido pelas células- β do pâncreas, cujo papel fisiológico principal é controlar a homeostase glicêmica por meio do estímulo à captação de glicose nos tecidos sensíveis à insulina (LEE & PILCH, 1994; DeFRONZO *et al.*, 2015). A redução da secreção de insulina, como resultado de uma disfunção autoimune das células- β pancreáticas mediadas por células T, ou a incapacidade das células responderem à presença da insulina, levam o indivíduo a uma condição chamada hiperglicemia, que é considerada a principal característica do diabetes (HARRIS *et al.*, 2018).

De acordo com estimativas da *International Diabetes Federation* (IDF), cerca de 425 milhões de pessoas ao redor do mundo têm diabetes e esse número alcançará a marca de 629 milhões de pessoas em 2045 (IDF Diabetes Atlas, 9th edition, 2019). No Brasil, os gastos com o diabetes no Sistema Público de Saúde superam os 67 milhões de reais por ano, segundo dados do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2011).

O T1D é uma desordem metabólica caracterizada pela destruição das células- β do pâncreas, culminando em deficiência absoluta de insulina. Na grande maioria dos casos, essa condição é atribuída a uma destruição autoimune das células- β (T1aD), enquanto que, na minoria deles, resulta de uma destruição idiopática ou falha no funcionamento do pâncreas (T1bD) (MAAHS *et al.*, 2010). De maneira geral, o T1D responde por cerca de 10 % do total de pacientes diabéticos no mundo e sempre está acompanhado de outras complicações crônicas (ROBERT *et al.*, 2018), com epidemiologia crescente de 3 % a 4 % ao ano, mundialmente (TUOMILEHTO, 2013). Tipicamente, o T1D é o tipo mais comum da doença em crianças e adolescentes, mesmo com o aumento da prevalência do T2D nessa população (LIESE *et al.*, 2006; DABELEA *et al.*, 2007).

1.2 Neuropatia diabética periférica (NDP)

Em termos gerais, a neuropatia periférica é uma desordem complexa que afeta os nervos periféricos sensoriais e autonômicos como consequência de trauma ou doença (FELDMAN *et al.*, 2017; GONÇALVES; VÆGTER; PALLESEN, 2018). Cerca de 8 % da população mundial é acometida por algum tipo de neuropatia periférica e esse número aumenta para 15 % em indivíduos com mais de 40 anos (GREGG *et al.*, 2004; FELDMAN *et al.*, 2017). Quando associada ao diabetes, a neuropatia periférica consiste em um processo patológico insidioso e progressivo, cuja severidade depende do grau de seu processo fisiopatológico. Nos Estados Unidos, as dores neuropáticas geram um prejuízo anual de mais de 100 bilhões de dólares e a neuropatia diabética está entre as mais comuns (McCARBERG & BILLINGTON, 2006). A neuropatia de origem diabética acomete 60 % dos diabéticos e é a causa mais comum de dor neuropática no mundo ocidental (EDWARDS *et al.*, 2008).

De maneira geral, a NDP pode provocar dor, de moderada a grave, nos membros inferiores em mais de 70 % dos pacientes (GANDHI & SELVARAJAH, 2015). Na fase inicial, a NDP comumente provoca parestesia dolorosa em um padrão conhecido como “meia-e-luva”, ou seja, apresenta distribuição bilateral e danos simétricos aos nervos das extremidades superiores e inferiores, com gradiente de gravidade maior de distal para proximal (CALLAGHAN *et al.*, 2012; TRUINI *et al.*, 2012; JENSEN & FINNERUP, 2014; FELDMAN *et al.*, 2017). Apesar dos esforços, no sentido de se fazer um diagnóstico precoce e interromper a progressão da NDP, ainda não há tratamento efetivo disponível em nível global, exceto o rigoroso controle da hiperglicemia. Isso, em partes, deve-se a não total compreensão da fisiopatologia da doença e a falta de estudos clínicos bem elaborados (YAGIHASHI; MIZUKAMI; SUGIMOTO, 2010).

A NDP consiste, primariamente, em um distúrbio dos nervos sensoriais, sendo que, no início do curso da doença, os pacientes comumente sofrem sintomas de parestesia, como sensação de formigamento e dormência, especialmente nas extremidades inferiores (FELDMAN *et al.*, 2017). O processamento sensorial desordenado pode provocar dor a estímulos que antes não provocariam (alodinia) e aumentar a sensibilidade a estímulos nocivos (hiperalgesia) (BOULTON, 2012). Só mais tarde, no curso da doença, parece haver evidências de disfunção de nervos motores, caracterizada como fraqueza distal dos membros.

Os axônios sensoriais são particularmente mais vulneráveis ao diabetes em comparação aos axônios motores. Em estágios mais avançados, a diminuição progressiva da sensibilidade das extremidades inferiores, somada ao posterior comprometimento motor, resulta em perda de equilíbrio, quedas e alterações no posicionamento dos pés (SCHWARTZ, et al., 2008; BENITEZ; CARNEIRO; OLIVEIRA, 2015; POP-BUSUI *et al.*, 2017).

As mudanças estruturais nas células e fibras nervosas ocorrem de maneira progressiva, seguindo as seguintes etapas: (i) degeneração axonal no sentido distal-proximal, com diminuição do comprimento dos axônios; (ii) danos às células de Schwann, conduzindo-as à morte; (iii) desmielinização paranodal em vista à perda de células de Schwann; (iv) perda das fibras mielinizadas e não mielinizadas (POLYDEFKIS *et al.*, 2004; CHOWDHURY; DOBROWSKY; FERNYHOUGH, 2011; ATHIÉ *et al.*, 2018). Apesar de evidências da morte de células da glia nos gânglios e nos nervos, não há evidências de apoptose de corpos neuronais sensoriais ou simpáticos nos gânglios das raízes dorsais (GRDs) (SIMA, 2003; ATHIÉ *et al.*, 2018).

Os mecanismos pelos quais a hiperglicemia pode levar a lesão nervosa periférica não estão totalmente compreendidos. De acordo com Yagihashi, Mizukami e Sugimoto (2010), diversas vias metabólicas afetadas pela hiperglicemia são responsáveis pela degeneração periférica: a via dos polióis (com atividade regulada pela Aldose Redutase (AR)) (LEE & CHUNG, 1999; BROWNLEE, 2001; YAN, 2014; SCHREIBER *et al.*, 2015); a glicosilação de proteínas e a produção de AGEs (*Advanced Glycation End-products*) (THORNALLEY, 2002; YAN, 2014; JURANEK *et al.*, 2015); a formação de radicais livres por conta do estresse oxidativo (GREENE *et al.*, 1999; POP-BUSUI; SIMA; STEVENS, 2006); suporte neurotrófico reduzido (ISHII, 1992; FERNYHOUGH & CALCUTT, 2010); aumento de atividade da proteína quinase C (PKC) (KOYA *et al.*, 1997; BROWNLEE, 2001); falência mitocondrial (AKUDE *et al.*, 2011; CHOWDHURY; DOBROWSKY; FERNYHOUGH, 2011; YAN, 2014) e processos pró-inflamatórios, envolvendo a ativação da via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (YOUNGER *et al.*, 1996; TOMLINSON, 1999; SATOH; YAGIHASHI; TOYOTA, 2003; YAMAGISHI *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2010). A complexa patogênese da NDP pode ser resumida de acordo com o esquema da Figura 1.

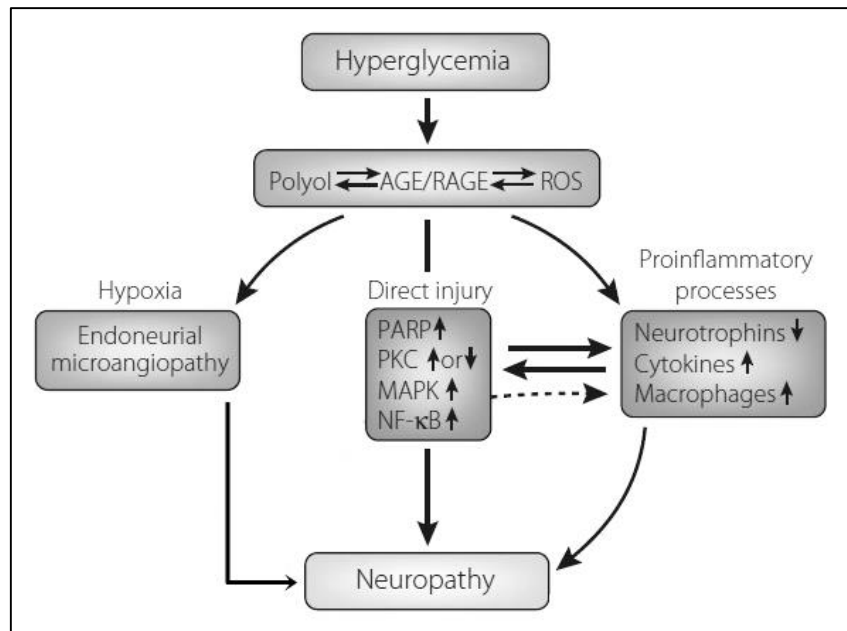


Figura 1. Patogênese da neuropatia diabética periférica (NDP). A hiperglicemia prolongada leva ao aumento da atividade da via de polióis, glicosilação e AGEs (*advanced glycation end-products*) e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A ativação desses fatores compromete o microfluxo sanguíneo no endoneuro e o tecido nervoso de maneira geral. Esse processo é mediado pela ativação de poli-ADP-ribose polimerase (PARP), alterações nas concentrações de PKC e aumento da expressão de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), bem como a ativação do fator nuclear B (NF-κB), resultando nas alterações estruturais e funcionais da NDP. O comprometimento metabólico do nervo periférico leva a reações pró-inflamatórias que envolvem a liberação de citocinas, supressão de neurotrofinas e migração de macrófagos, promovendo a neuropatia. Fonte: Adaptado de Yagihashi S., Mizukami H., e Sugimoto K. (2010). *Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go?* Journal of Diabetes Investigation. v. 2, n. 1, p. 26.

É bem estabelecida a ocorrência de hiperalgesia mecânica em modelos experimentais de neuropatia diabética (WUARIN-BIERMAN *et al.*, 1987; AHLGREN; LEVINE, 1993; COURTEIX *et al.*, 1993; CAMPBELL & MEYER, 2006). Há estudos que relatam um aumento considerável de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina-1 beta (IL-1β) e o fator de necrose tumoral α (TNF-α) no GRD de animais com hiperalgesia neuropática diabética, quando comparados a animais diabéticos sem hiperalgesia (TSUDA *et al.*, 2008; WODARSKI *et al.*, 2009; GALLOWAY & CHATTOPADHYAY, 2013). Nesse contexto, Athie e colaboradores (2018) observaram, por meio de caracterização funcional do GRD de ratos diabéticos neuropáticos, alterações na expressão de genes relacionados à inflamação,

hiperalgesia ou analgesia, proliferação celular e apoptose. Isso demonstra que alterações moleculares no GRD podem ocorrer em paralelo às alterações periféricas sensoriais.

A literatura em torno dos vários fenômenos que envolvem a hiperglicemia – estresse osmótico, estresse oxidativo, glicação, entre outros – revela um tópico recorrente, que concerne às proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), as quais respondem a estímulos extracelulares, por meio de dupla fosforilação de resíduos de treonina e tirosina (JOHNSON & LAPADAT, 2002; MANNING & DAVIS, 2003). Existem três principais grupos de MAPKs: quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), quinases c-Jun-N-terminal (JNK) e quinases p38 (YANG *et al.*, 2003; BONNY *et al.*, 2005). De maneira geral, as MAPKs coordenam diversas funções, tais como a transcrição de genes, síntese proteica, ciclo celular, proliferação, diferenciação e morte celular (JOHNSON & LAPADAT, 2002; KRISHNA & NARANG, 2008).

As três famílias de MAPKs (ERK1/2, JNK e p38) parecem ser ativadas nos neurônios sensoriais expostos à altas concentrações de glicose (hiperglicemia), tanto em experimentação *in vitro* quanto em nervos periféricos de ratos (PURVES *et al.*, 2001). Ratos diabéticos demonstraram marcação de fosforilação e migração nuclear de p38 em neurônios sensoriais do GRD, processo que foi revertido com a administração de um inibidor de p38 (PRICE *et al.*, 2004). Outro estudo também observou que a ativação de p38 causa a fosforilação de alguns alvos extranucleares de interesse para o estudo dos mecanismos da dor neuropática, como o canal de sódio voltagem-dependente Na_v1.6 (WITTMACK *et al.*, 2005).

De maneira similar a p38, a ativação de JNK em neurônios expostos à alta concentração de glicose pode levá-los à apoptose via ativação de caspase-3 (CHENG & FELDMAN, 1998; VINCENT *et al.*, 2005; TOMLINSON & GARDINER, 2008). Também há crescente evidência para o envolvimento da p38 ativada no GRD quando da gênese da hiperalgesia decorrente do diabetes (TSUDA *et al.*, 2004; DAULHAC *et al.*, 2006; PIAO *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2007). De acordo com Vincent e colaboradores (2011), pode-se considerar que a p38 funciona como um mediador inflamatório ligado à via nociceptiva da neuropatia diabética, uma vez que a administração do inibidor de p38 (SB-681323) levou a um rápido alívio da dor neuropática após 14 dias de tratamento.

Apesar de um grande número de fármacos terem sido utilizados para o tratamento da dor neuropática diabética, os resultados dos estudos clínicos apontam para pouca eficácia,

uma vez que menos da metade dos pacientes tratados referem melhoras do quadro hiperalgésico (O'CONNOR & DWORKIN, 2009).

1.3 Terapia laser de baixa intensidade (LLLT, do inglês “*Low-Level Laser Therapy*”)

1.3.1 Luz

A luz é parte do espectro de radiação eletromagnético, o qual varia das ondas de rádio até os raios gama. De acordo com as equações de *Maxwell*, a luz possui amplitude, a qual determina o seu brilho; possui comprimento de onda (λ), que determina sua cor e possui polarização. O λ é definido como a largura de uma oscilação completa de onda. De acordo com a teoria quântica, o espectro eletromagnético consiste de partículas (fótons), que são pequenos “pacotes” de energia movendo-se na velocidade da luz. Quanto maior o número de fótons, maior o brilho da luz (CHUNG *et al.*, 2011).

O espectro eletromagnético contém comprimentos de onda cada vez menores quanto maior a frequência (Hz). A relação entre a frequência e o comprimento de onda pode ser sumarizada no espaço livre pela equação:

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad (1)$$

Sendo λ o comprimento de onda [em metros (m)], c a velocidade da luz [em metros por segundo (m/s)] e f a frequência [em Hertz Hz].

Duas teorias são empregadas no estudo das propriedades da luz: a ondulatória (teoria de *Maxwell*) e a quântica (teoria de *Max Planck*). De acordo com *Planck*, a onda transporta “quanta” de energia. Os fótons de um determinado comprimento de onda têm uma energia quantal discreta e invariável, que pode ser calculada pela frequência inerente (f) e a constante de *Planck* (h), de acordo com a equação:

$$E = hf \quad (2)$$

De modo que E é a energia do fóton [em Joule (J)]. Dado que o comprimento de onda e a frequência são relacionados no espaço livre (equação 1), pode-se estabelecer:

$$E = hc / \lambda \quad (3)$$

Sendo E a energia do fóton (J); h a constante de *Planck*; c a velocidade da luz (m/s); λ o comprimento de onda (m). De acordo com as equações apresentadas (1-3), é possível observar que, associados aos menores comprimentos de onda da luz, estão fótons carregando maiores quantidades de energia e vice-versa. Essas informações são importantes ao considerarmos a interação da luz com os tecidos biológicos.

1.3.2 Interações da luz com os tecidos biológicos

Quando a luz atinge o tecido biológico, parte dela é refletida, outra parte é absorvida e, por fim, transmitida pelas camadas teciduais. A reflexão acontece na superfície do tecido em contato com o ar e obedece ao índice de refração do tecido, como afirmado pela Lei de *Snellius* (BLOEMBERGEN & PERSHAN, 1962):

$$\frac{\sin\theta_1}{\sin\theta_2} = \frac{n_1}{n_2} \quad (4)$$

Em que θ_1 é o ângulo entre a luz e a superfície do ar, θ_2 o ângulo entre o raio e a superfície do tecido, n_1 o índice de refração do ar e n_2 o índice de refração do tecido.

Quanto à absorção da luz, um fóton só é absorvido quando sua energia corresponde à diferença de energia entre estados quantizados. É por conta do fenômeno da absorção que são observados efeitos da luz sobre tecidos biológicos (CHUNG *et al.*, 2011), devido ao desencadeamento de reações fotoquímicas nas células, mesmo com baixos níveis de energia, fenômeno conhecido como fotobiomodulação ou bioestimulação (KARU, 1989),

especialmente relacionados à região do espectro infravermelho (780-1000 nm) (TSAI & HAMBLIN, 2017).

A LLLT (do inglês “*Low-Level Laser Therapy*”) é definida como o tratamento em que se faz uso da radiação luminosa de baixa intensidade, cujos efeitos desencadeadores são exclusivamente atribuídos à luz e não ao calor. No caso da LLLT, o dispositivo emissor de luz é um LASER de baixa potência (acrônimo do inglês “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”) [Medical Subject Headings (MeSH) Descriptor Data, 2017]. As fontes de luz mais comumente utilizadas para terapia compreendem os lasers Hélio-Neônio (HeNe; 632,8 nm), Gálio-Alumínio (GaAl; 630-685 nm), Arseneto de Hélio-Neônio (HeNeAs, 780-870 nm) e Arseneto de Gálio (AsGa; 904 nm), além dos diodos emissores de luz (LEDs) com faixa espectral de 670 a 950 nm (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004).

A fotobiomodulação e/ou a LLLT compreendem processos atômicos, mediados por cromóforos endógenos, os quais envolvem eventos fotofísicos (lineares ou não lineares) e fotoquímicos, em várias escalas biológicas. Esses processos resultam em efeitos terapêuticos que incluem, principalmente, a melhora da dor e inflamação, imunomodulação, cicatrização de feridas e regeneração de tecidos (BJORDAL *et al.*, 2003; GIGO-BENATO; GEUNA; ROCHKIND, 2005; POSTEN *et al.*, 2005; CHRISTIE *et al.*, 2007; JAMTVEDT *et al.*, 2008; CHOW *et al.*, 2009; CHUNG *et al.*, 2011; ANDERS; LANZAFAME; ARANY, 2015; VIEIRA *et al.*, 2016; TSAI & HAMBLIN, 2017; VIEIRA *et al.*, 2018).

A 1ª Lei da Fotobiologia determina que, para que gere algum efeito biológico, fótons de luz precisam ser absorvidos por moléculas, chamadas de cromóforos, localizadas nos tecidos biológicos (HAMBLIN, 2018). Tiina Karu e Salvatore Passarella foram os primeiros a sugerir que um dos principais cromóforos teciduais, responsáveis pelo efeito da LLLT, está localizado na mitocôndria (PASSARELLA & KARU, 2014). Já havia sido observado que as mitocôndrias respondem por 50 % da absorção óptica em fígados de ratos (*blood-free*) expostos à irradiação no infravermelho próximo (780 nm) (BEAUVOIT *et al.*, 1994). Também foi observado, por meio de experimentos *in vitro*, que a enzima citocromo c oxidase (CCO) purificada, pode ser ativada pela irradiação com um dispositivo laser na cor vermelha (633 nm) (PASTORE; GRECO; PASSARELLA, 2000). O CCO é a unidade IV da cadeia respiratória mitocondrial, sendo uma molécula complexa, formada por 13 subunidades

proteicas que contêm 2 diferentes centros de cobre, Cu_A e Cu_B , associados a 2 centros heme, heme-*a* e heme-*a*₃. Todos esses centros podem estar em estado reduzido ou oxidado, oferecendo um total de 16 possibilidades. O CCO transfere 4 prótons para o oxigênio molecular para formar 2 moléculas de água, a partir de elétrons da redução do citocromo c. O gradiente de prótons formado determina a atividade da ATP-sintase (KARU & KOLYAKOV, 2005; WONG-RILEY *et al.*, 2005).

A conversão da energia luminosa nos tecidos biológicos resulta na modulação de vias de sinalização, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), aumento da produção de ATP (adenosina trifosfato), óxido nítrico (NO), Ca^{2+} e grupos fosfato inositol (IRVINE & SCHELL, 2001; SANTANA-BLANK; RODRÍGUEZ-SANTANA; SANTANA-RODRÍGUEZ, 2005; KARU, 2008; De FREITAS & HAMBLIN, 2016). O provável mecanismo molecular básico da LLLT (via sinalização retrógrada pela mitocôndria) está representado no esquema da Figura 2.

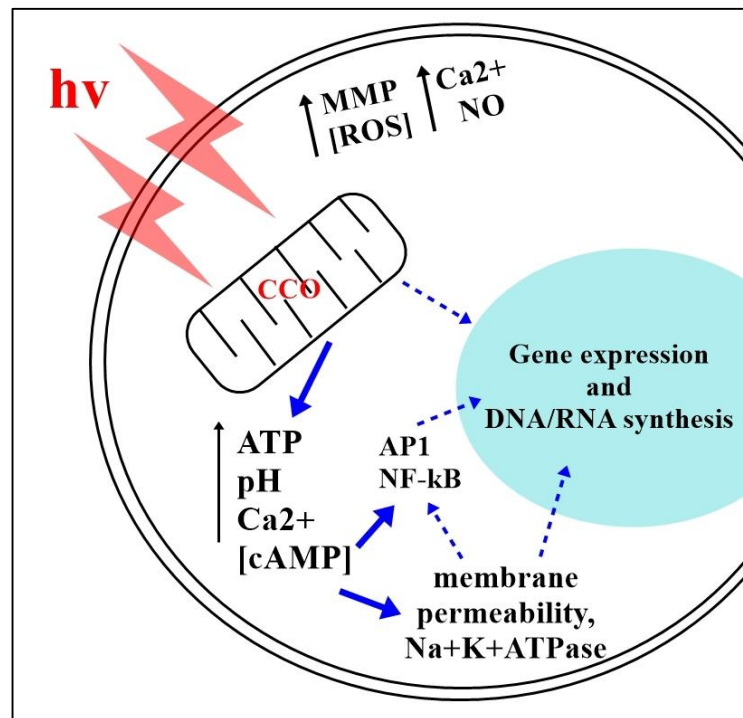


Figura 2. Mecanismo fotobiomodulador da LLLT: sinalização retrógrada pela mitocôndria. O citocromo c oxidase (CCO) é a enzima terminal da cadeia transportadora de elétrons, que medeia o transporte de elétrons entre o citocromo c e o oxigênio molecular. O CCO age como fotorreceptor e transdutor de sinal luminoso na região dos espectros vermelho e infravermelho da luz (*hν*). A LLLT aumenta a disponibilidade de elétrons para

redução do oxigênio molecular no centro catalítico do CCO, aumentando o potencial de membrana mitocondrial (MMP) e os níveis de ATP, Ca^{2+} , cAMP, NO e EROs (KARU, 2008). As vias principais estão representadas pelas **setas azuis** contínuas e as vias secundárias pelas setas pontilhadas. Fonte: Acervo do autor.

Uma das características da LLLT é o comportamento bifásico da curva dose-resposta, também conhecido como *Lei de Arndt-Schulz* (SOMMER *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011; HAMBLIN, 2018). De acordo com esse princípio, uma dose muito baixa de energia luminosa é incapaz de gerar efeito biológico, enquanto que uma dose alta tem efeito positivo até que seja atingido um platô, por meio do estímulo à atividade do CCO. Quanto mais próximo do ponto de saturação, menor o efeito biológico gerado pela LLLT. A manutenção da alta energia, além do platô de absorção pelas células, pode levar a danos teciduais (HAMBLIN, 2018). Desse modo, acredita-se que doses médias de energia entregues às células, ou seja, pouco abaixo da máxima absorção pelas mitocôndrias, podem induzir a liberação de fatores celulares ligados a vias de proteção, como enzimas antioxidantes e fatores anti-apoptóticos, levando a expressão de proteínas que protejam o tecido contra danos subsequentes, que poderiam ser letais (AGRAWAL *et al.*, 2014).

A outra forma pela qual a LLLT estimula a atividade mitocondrial está relacionada ao NO. Este, por sua vez, exerce efeito inibitório sobre o CCO devido a sua alta afinidade pelos complexos mitocondriais, ligando-se de maneira não covalente entre os centros heme-*a3* e Cu_B (SARTI *et al.*, 2012). Acredita-se que a absorção de fótons de luz vermelha e/ou infravermelha, provoque um fenômeno de fotodissociação sobre a ligação do NO ao CCO, permitindo, assim, a ligação do oxigênio mitocondrial aos respectivos sítios antes ocupados pelo NO e o estímulo ao adequado funcionamento da cadeia transportadora de elétrons (LANE, 2006), conforme ilustrado no esquema da Figura 3.

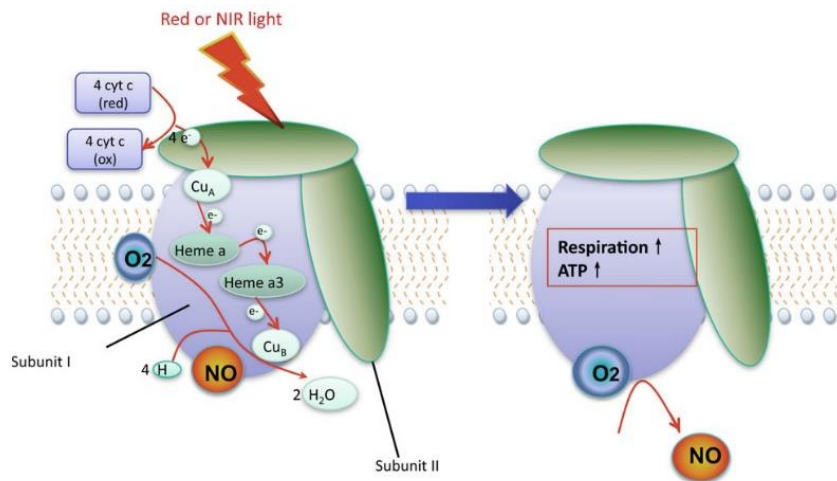


Figura 3. Fotodissociação do óxido nítrico (NO) a partir do citocromo c oxidase (CCO). O CCO é um complexo proteico formado por multisubunidades enzimáticas e que contém dois co-fatores heme e dois centros de cobre (Cu_A e Cu_B), que oxidam quatro moléculas reduzidas no citocromo c e, ao mesmo tempo, reduzem o oxigênio à água, produzindo quatro prótons que servirão para a produção de ATP, por meio da ATP-sintase. Todo esse processo pode ser inibido pelo NO, quando este se liga (não covalentemente) ao Cu_B ; ligação essa que pode ser revertida por meio da fotobiomodulação promovida por fótons de luz vermelha e/ou infravermelha. A fotodissociação do NO aumenta a taxa de respiração celular e, conseqüentemente, a produção de ATP. Fonte: Adaptado de Hamblin, M. R. (2018) *Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation*. Photochemistry and Photobiology. v. 94, n. 2, p. 2.

Como os principais cromóforos teciduais estão contidos na mitocôndria, os tipos celulares mais responsivos à LLLT são aqueles que possuem as maiores quantidades de mitocôndrias e uma alta atividade metabólica, como as células musculares (cardíacas e esqueléticas), neurônios, células do fígado, rim e outros órgãos internos, isto é, células que, tipicamente, não se encontram expostas diretamente à luz solar (HAMBLIN, 2018).

1.3.3 Analgesia promovida pela LLLT

Acredita-se que a analgesia mediada pela LLLT se deva à vários efeitos biomoduladores, como a própria absorção pelos cromóforos mitocondriais (especialmente o CCO), vasodilatação, estimulação da divisão celular, liberação de NO, aumento nos níveis de cortisol e síntese proteica, aumento da concentração intracelular de cálcio e aumento da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (PERES E SERRA & ASHMAWI,

2010), entretanto, devido à heterogeneidade dos parâmetros usados na terapia, é difícil estabelecer o correto mecanismo que leva à analgesia.

As aplicações mais comuns da LLLT envolvem os comprimentos de onda do vermelho e do infravermelho próximo (MARKOVIĆ & TODOROVIĆ, 2006; TANBOGA *et al.*, 2011) e alguns estudos clínicos têm demonstrado a eficácia da LLLT em promover analgesia e melhora da função, em diferentes tipos de neuropatias por compressão do nervo periférico, como a síndrome do túnel do carpo, por exemplo (BARBOSA *et al.*, 2012). Revisões sistemáticas da literatura e metanálises de estudos controlados randomizados, têm demonstrado efeitos positivos da LLLT no tratamento de dor cervical e lombar crônicas (CHOW & BARNESLEY, 2005; CHOW *et al.*, 2009; HOLANDA *et al.*, 2017).

Uma vez que a LLLT pode agir, em partes, por meio de um mecanismo anti-inflamatório no tecido alvo, o tratamento de neuropatias associadas a graus de inflamação tecidual, usando essa terapia, pode ser eficaz (BYRNES *et al.*, 2005; PEPLOW *et al.*, 2011; ALCANTARA *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2013). Considerando o envolvimento do sistema nervoso central no processamento do sinal doloroso, é importante notar que a LLLT pode alterar os fenótipos microgлияis de pró-inflamatório para anti-inflamatório (M1/M2), de uma maneira dose-dependente (von LEDEN *et al.*, 2013). Vários estudos pré-clínicos analisaram os efeitos da LLLT em marcadores inflamatórios relacionados à modelos de neuropatias crônicas. Há relatos sobre a redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e HIF-1 α) em modelo de neuropatia por constrição (HSIEH *et al.*, 2012) e esmagamento (CIDRAL-FILHO *et al.*, 2013) do nervo isquiático em roedores.

Aparentemente, o efeito analgésico da LLLT está relacionado a um bloqueio na condução nervosa, tanto central quanto periférica, a liberação de endorfinas (CHAN; ARMATI; MOORTHY, 2012) e ativação de receptores opióides (PERES E SERRA & ASHMAWI, 2010). A luz com irradiância superior a 300 mW/cm⁻², quando absorvida por nociceptores pode inibir fibras A δ e C, diminuindo a velocidade de condução nervosa e a amplitude dos potenciais de ação. Também foi observado que a LLLT pode bloquear o transporte anterógrado de mitocôndrias ricas em ATP nos neurônios do GRD, o que leva a formação de varicosidades, geralmente associadas ao rompimento de microtúbulos (CARROLL *et al.*, 2014). Com base nessas informações, é importante o desenvolvimento de estudos pré-clínicos, no âmbito das ciências básicas e/ou aplicadas, com abordagens *in vivo* e

in vitro, para melhor compreender os mecanismos subjacentes à aplicação da LLLT no tratamento de neuropatias crônicas, como é o caso da NDP.

2 JUSTIFICATIVA

Há lacunas na compreensão dos mecanismos envolvidos no uso da LLLT para o controle da dor neuropática de maneira geral e principalmente àquela relacionada ao diabetes. Até o que se sabe, a partir de dados de estudos clínicos, pacientes referiram melhoras na percepção da dor resultante de neuropatias periféricas após o tratamento com LLLT, porém, são raros os trabalhos que estudaram mais detalhadamente os efeitos anti-hiperalgésicos do laser de baixa intensidade nas neuropatias crônicas. Acreditamos que os resultados deste estudo servirão como importantes subsídios na ampliação do conhecimento sobre os mecanismos celulares e moleculares da neuropatia diabética e principalmente do uso de uma terapia não farmacológica e não invasiva, sem efeitos colaterais e de baixo custo, no tratamento dessa condição patológica.

Em estudos envolvendo os efeitos analgésicos desse tipo de terapia em humanos, o viés do efeito placebo, embora seja um importante aliado na clínica, impõe, mesmo em estudos controlados, randomizados e duplo-cegos, uma variável difícil de ser controlada. Portanto, a convalidação em modelos animais e a compreensão dos mecanismos de ação são importantes aliados na consolidação e/ou na avaliação custo-benefício do uso destas terapias no controle da dor.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo consistiu em compreender, experimentalmente, como a terapia laser de baixa intensidade (LLLT), no espectro infravermelho (904 nm), pode atuar na redução da hiperalgesia neuropática de origem diabética, estudando os mecanismos de ação desta terapia.

3.2 Objetivos específicos

- (i) Verificar o efeito da LLLT sobre a hiperalgesia mecânica decorrente da neuropatia diabética experimental e caracterizar possíveis alterações motoras relacionadas à esta condição patológica, considerando também o efeito da LLLT sobre a função motora dinâmica dos ratos diabéticos hiperalgésicos;
- (ii) Verificar se a LLLT altera a expressão de mRNAs que codificam proteínas quinases ativadas por mitógenos [MAPKs p38, c-Jun-N-terminal (JNK) e ERK1/2] nos GRDs L4 e L5 de ratos diabéticos hiperalgésicos;
- (iii) Investigar, por meio de ensaios de Western blot e Imunofluorescência do GRD, os efeitos da LLLT na expressão das formas fosforiladas das MAPKs (p38, JNK e ERK1/2). Avaliar, ainda, os níveis de citocinas pró- (IL-1 β , TNF α , IL-6 e CINC-1) e anti-inflamatória (IL-10) no GRD, considerando o efeito da LLLT sobre a concentração destas citocinas;
- (iv) Realizar a caracterização, por espectroscopia vibracional (Raman), dos GRDs de ratos diabéticos hiperalgésicos, submetidos ou não ao tratamento com LLLT, e estudar os efeitos da LLLT sobre as possíveis alterações espectrais observadas;

- (v) Verificar o efeito direto da LLLT *in vitro*, sobre culturas primárias de neurônios do GRD mantidos em meio que mimetiza o diabetes tipo I, considerando aspectos da dinâmica de cálcio intracelular, potencial de membrana mitocondrial (MMP), potencial da membrana neuronal e de viabilidade celular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Ratos Lewis isogênicos (*Rattus norvegicus*; albinos; LEW/HsdUnib, Harlan, EUA, 1996), machos, 4-8 semanas de idade, massa corpórea de 200-250 g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB), foram utilizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), protocolos nº. 3902-1 e nº. 5337-1/2019. Também foram seguidas as recomendações do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), do *Committee for Research and Ethical Issues* da *International Association for the Study of Pain* (IASP) sobre o uso de animais de laboratório, e do ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) *guidelines*.

Para os experimentos realizados no *Institut de Neurosciences des Systèmes* (INS, INSERM UMR_S 1106), *Aix-Marseille Université*, Marselha, França, ratos Lewis isogênicos (*Rattus norvegicus*; albinos; LEW/Crl, New Orleans, EUA, 1970), machos, 4-5 semanas de idade, massa corpórea de aproximadamente 200 g, provenientes da Charles River Laboratories (Charles River Germany GmbH & Co., Sulzfeld, Alemanha), foram utilizados de acordo com o *Council Directive 2010/63EU of the European Parliament* e o *Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes*.

Os ratos permaneceram em gaiolas apropriadas para a acomodação de quatro animais cada, alocadas em estantes ventiladas, com temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e umidade ($55 \% \pm 5 \%$) controladas e fotoperíodo determinado de 12 h claro / 12h escuro. Os ratos tiveram livre acesso à água e ração *ad libitum* no decorrer de todos os experimentos. Ratos utilizados no estudo *in vivo*, foram divididos por meio de randomização simples em cinco grupos principais: **Naïve** (animais saudáveis; não foram submetidos às injeções de estreptozotocina ou veículo, tampouco à LLLT); **STZ** (animais diabéticos neuropáticos; receberam injeções de estreptozotocina); **SCB** (animais controle; receberam injeção do veículo da estreptozotocina, tampão citrato de sódio); **STZ+LLLT** (animais diabéticos neuropáticos; receberam injeções

de estreptozotocina e foram submetidos ao tratamento com LLLT); **SCB+LLLT** (animais controle; receberam injeção do veículo da estreptozotocina e foram submetidos ao tratamento com LLLT). Os grupos experimentais foram repetidos até que o número de amostras de GRD para as diferentes técnicas fosse atingido, totalizando 592 ratos ao longo de toda a execução do delineamento experimental.

Para a primeira etapa do estudo, em que foram analisados os efeitos preventivos da LLLT durante o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica, foram ainda considerados os seguintes grupos: **STZ+LLLT 4.06 J** (animais diabéticos que foram submetidos ao tratamento com LLLT na dose total de energia de 4,06 J); **STZ+LLLT 8.12 J** (animais diabéticos que foram submetidos ao tratamento com LLLT na dose total de energia de 8,12 J); **SCB+LLLT 4.06 J** (animais controle; receberam injeção do veículo da estreptozotocina e foram submetidos ao tratamento com LLLT na dose total de energia de 4,06 J) e **SCB+LLLT 8.12 J** (animais controle; receberam injeção do veículo da estreptozotocina e foram submetidos ao tratamento com LLLT na dose total de energia de 8,12 J).

4.2 Indução de diabetes tipo I por múltiplas doses de estreptozotocina

Os animais dos grupos STZ e STZ+LLLT receberam múltiplas injeções de estreptozotocina (STZ; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), via intraperitoneal (i. p.), na concentração de 25 mg/kg cada. A STZ foi diluída em 0,1 M de tampão citrato de sódio (pH 4,5 ajustado por ácido cítrico) imediatamente antes das injeções, as quais foram realizadas uma vez ao dia, durante cinco dias consecutivos, de acordo com protocolo descrito por Furman (2015), e já utilizado pelo grupo de pesquisa (ATHIÉ *et al.*, 2018; TEIXEIRA *et al.*, 2019; do PRADO *et al.*, 2020). Os animais dos grupos controle (SCB e SCB+LLLT) receberam injeção de veículo em dose correspondente [tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 4,5)], durante o mesmo período e número de injeções (uma vez ao dia, durante cinco dias consecutivos). A glicose plasmática matinal foi medida, periodicamente, por punção venosa caudal com auxílio de fitas de teste impregnadas com glicose oxidase (Accu Chek® Sensor

Comfort, Roche Diagnostics, Alemanha). O diabetes foi definido clinicamente pela presença de glicemia plasmática ≥ 250 mg/dL após 48 h da última injeção de STZ.

4.3 Teste de pressão na pata: Randall-Selitto

Um dos testes empregados para a quantificação da hiperalgesia mecânica na pata dos ratos foi proposto por Randall & Selitto (1957) e vem sendo utilizada há anos na análise da hiperalgesia mecânica em modelo de neuropatia diabética experimental (AHLGREN & LEVINE, 1993). Para realização do teste utilizamos um analgesímetro (Ugo Basile®, Itália) que permite aplicação de força mecânica linear com aumento gradual no dorso da pata dos ratos. O registro do limiar de retirada da pata foi quantificado pela média de 4 medidas realizadas em intervalos de 5 min e o cálculo foi feito a partir da variação no limiar mecânico (subtração do limiar registrado após as injeções de STZ/SCB do valor prévio antes do início das injeções da droga/veículo, período considerado basal). O valor de corte (*cut-off*) para o teste Randall-Selitto foi estabelecido em 140 g, com base em resultados prévios obtidos pelo grupo de pesquisa, em estudos de dor crônica e inflamatória (do PRADO *et al.*, 2020). Todas as respostas de retirada da pata (*paw withdrawal*) observadas ocorreram antes do valor de corte.

4.4 Teste de pressão crescente: von Frey eletrônico

O outro método adotado para avaliação da hiperalgesia mecânica na pata de ratos foi por pressão crescente com estímulo plantar, previamente descrito por Moller e colaboradores (1998). Resumidamente, este método utiliza um anestesímetro eletrônico (Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, a qual é expressa em grama (g). Ao transdutor de pressão, é adaptada uma ponteira Universal Tips 10 μ L (T-300, Axygen®, EUA) que estimula diretamente a planta da pata posterior do animal. O experimentador (cego aos grupos e tratamentos) foi treinado a aplicar a ponteira em ângulo reto na região central das patas traseiras do animal com uma pressão gradualmente crescente, até provocar uma resposta de flexão característica, resultando

na retirada da pata. O estímulo então é interrompido após a observação da resposta descrita acima e o aparelho registra o valor máximo, em grama-força (g), aplicado pelo avaliador.

Foram realizadas cinco medidas distintas para cada animal, sendo calculada a média aritmética das medidas. A intensidade de hiperalgesia é quantificada como a variação na pressão (Δ de reação em g), obtida após subtrair o valor observado antes do início das injeções de STZ ou veículo (basal) do valor de reação (após 7, 14, 21, 24 e 28 dias do início das injeções de STZ ou veículo). Durante o Teste de von Frey, os animais são mantidos em caixas acrílicas de 12 x 10 cm e 17 cm de altura, com uma das paredes transparente. O assoalho sob as caixas é formado por uma rede de malhas com aproximadamente 5 mm², de arame não maleável de 1 mm de diâmetro. As caixas são afixadas a 25 cm da superfície da bancada, de maneira a permitir a estimulação da pata traseira dos animais. Sob a rede de malhas, em um ângulo de 45°, é afixado um espelho que permite o avaliador visualizar a imagem da região plantar a ser estimulada com a ponteira do transdutor de pressão. Antes do início do teste, os animais permaneceram dentro das caixas de acrílico por, aproximadamente, 30 min para reconhecimento e adaptação ao espaço.

4.5 Terapia laser de baixa intensidade (“*Low-level laser therapy*”, LLLT)

4.5.1 LLLT in vivo

Para aplicação da LLLT no estudo *in vivo*, foi utilizado o aparelho de emissão Laser Endophoton LLT-1307 (KLD® Ltda. Amparo, SP, Brasil), probe de 904 nm, Arseneto de Gálio (AsGa), classe IIIB, com escalas graduadas em Joules e minutos/segundos. Os parâmetros da irradiação estão descritos na Tabela 1 e seguem as recomendações da WALT (*World Association for Laser Therapy*), que considera o tipo de tecido a ser irradiado e a profundidade em que ele se encontra.

Tabela 1. Parâmetros da LLLT para o estudo *in vivo*.

Laser	λ	Potência	Feixe de saída	Irradiância
AsGa	904 nm	70 mW	0,001 cm ²	7000 mW/cm ²
Emissão	Energia total*	Tempo	Área de tratamento	Contato
Contínua	2,03, 4,06 e 8,12 J	29”, 58” e 1’52”	1,0 cm ²	Direto

AsGa = Arseneto de Gálio; λ = comprimento de onda; mW = miliWatts; cm² = centímetros quadrados; mW/cm² = miliWatts por centímetro quadrado; J = Joule; ’ = minuto; ” = segundo. *Energia total em um único ponto.

A LLLT foi realizada diariamente, do 7º ao 28º dia do protocolo experimental, para o estudo dos efeitos da terapia durante o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica, e do 21º ao 28º dia do protocolo experimental, para o estudo dos efeitos da terapia após o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica. As aplicações aconteceram com as lâmpadas da sala acesas e sempre no mesmo período do dia. Os animais receberam isoflurano inalatório (Cristália®, Itapira, SP, Brasil) a 3 % em câmara de anestesia e em seguida foram mantidos em máscara de anestesia acoplada à região rostral da face, com anestésico a 2 % durante o tempo necessário para aplicação do laser (aproximadamente 1 min). Após tricotomia da região lombar para atenuar a reflexão da luz e antisepsia local, os ratos foram posicionados sobre um cilindro para elevar a região lombar em decúbito esternal e, por palpação, a vértebra L5 foi identificada. O feixe de laser foi incidido diretamente, em ponto único, sobre o dorso dos animais na região vertebral entre L4 e L5, bilateralmente, em um ângulo de 90°.

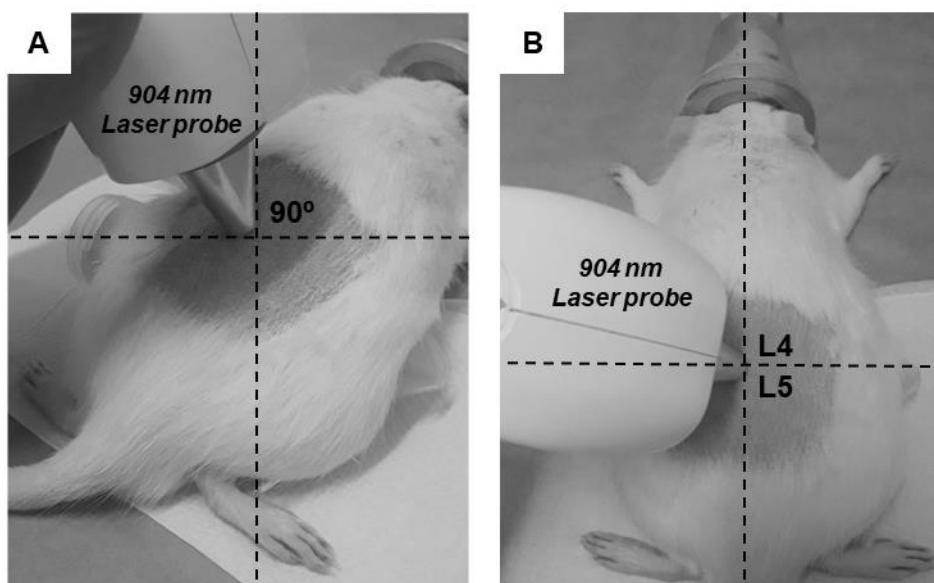


Figura 4. LLLT aplicada à região dorsal L4-L5. Painel A: Para irradiação da região dorsal, os ratos são mantidos sob anestesia inalatória (Isoflurano, 3 %), posicionados em decúbito ventral. A região de interesse é tricotomizada com intuito de atenuar a reflexão da luz. O laser probe AsGa (904 nm), classe IIIB, é posicionado em contato direto com a pele, perpendicularmente, em um ângulo de 90°. **Painel B:** Após palpação das estruturas anatômicas, o laser probe é posicionado sobre o espaço intervertebral L4-L5, a fim de que os respectivos gânglios das raízes dorsais recebam a irradiação do feixe infravermelho de maneira uniforme. O dispositivo é acionado por controle manual e desliga, automaticamente, terminado o tempo estipulado para a dose desejada. São realizados dois pontos por animal, um à direita e outro à esquerda. Ratos do grupo STZ (sem tratamento), são submetidos à mesma manipulação, porém com o dispositivo laser inoperante. Fonte: Acervo do autor.

4.5.2 LLLT *in vitro*

Para o estudo da dinâmica de cálcio intracelular (item 4.16), as culturas primárias de neurônios oriundos do GRD (lamínulas de cultura de 25 mm de diâmetro) foram expostas à LLLT por meio da técnica de varredura (*swiping motion*). Para o ensaio de viabilidade celular por MTT (item 4.20) e citometria de fluxo para marcação de células apoptóticas/necróticas (item 4.21), a LLLT foi aplicada por meio da técnica pontual, ou seja, sobre cada poço de cultura (*well*) individualmente, em uma placa de 96 poços. Ambas as técnicas de irradiação com laser, *swiping motion* ou pontual, foram empregadas com a dose de 2,03 J, durante 29 s, com contato indireto da caneta aplicadora, a uma distância de aproximadamente 1 cm da monocamada celular.

4.5.2.1 LLLT por meio do sistema de fibra óptica COFS (Customized Optical Fiber System)

O sistema COFS (*customized optical fiber system*) foi desenvolvido no *Centre de Microélectronique de Provence*, Departamento de Bioeletrônica (BEL), da *École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne* (EMSE), Gardanne, França, especialmente para este trabalho¹. O sistema, ilustrado na Figura 5, consiste basicamente do acoplamento do laser probe 904 nm a um conjunto formado por uma lente óptica côncava do tipo Plano-Concave Spherical® (Thorlabs, Newton, NJ, EUA) e uma lente óptica convexa do tipo Plano-Convex Spherical® (Thorlabs, Newton, NJ, EUA), que permite a injeção da luz no orifício de entrada (*input*) de uma fibra óptica revestida (*cladding*), do tipo 780HP Single Mode Optical Fiber® (Thorlabs, Newton, NJ, EUA), de 125 µm de diâmetro.

A potência de saída (*output*) (1,2 mW ~ 20 mW) da luz emitida pelo dispositivo laser foi controlada por meio de um filtro óptico retangular, com densidade óptica graduada entre 0,04 – 4 OD, do tipo UV Fused Silica (UVFS) ND Filter® (Thorlabs, Newton, NJ, EUA) (25 mm x 100 mm), posicionado entre o laser probe e a lente óptica côncava, de maneira a permitir mais ou menos passagem de luz. A potência da luz na saída da fibra óptica, a ser entregue para as células, foi aferida com auxílio de um console digital portátil para medição de energia PM100D® (Thorlabs, Newton, NJ, EUA), conectado a uma esfera de integração S142C® (Thorlabs, Newton, NJ, EUA). A injeção da luz laser foi controlada por meio de um micromanipulador MBT616 Microblock Flexure Platform® (Thorlabs, Newton, NJ, EUA) conectado firmemente ao laser probe Endophoton LLT-1307 (KLD® Ltda. Amparo, SP, Brasil). A extremidade distal da fibra óptica foi posicionada com auxílio de um MT1/M Single-Axis Translation Stage® (Thorlabs, Newton, NJ, EUA), com resolução de 10 µm, acoplado perpendicularmente a uma plataforma MT3/M-XY Translation Stage® (Thorlabs, Newton, NJ, EUA). O feixe de saída, a partir da fibra óptica, foi mantido em um ângulo de 45°, o mais próximo possível dos neurônios do GRD no campo de interesse.

O estágio de injeção da luz do sistema COFS (Figura 5, Painel A), com exceção do modulador Endophoton LLT-1307 (KLD® Ltda. Amparo, SP, Brasil), foi construído sobre

¹ Ver Apêndice F, para maiores detalhes. Esta parte da metodologia foi desenvolvida durante estágio de pesquisa no exterior (BEPE/FAPESP Processo número 2018/05108-8), na *École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne* (EMSE), Departamento de Bioeletrônica do *Centre Microélectronique de Provence*, Gardanne, Provence-Alpes-Côte D’Azur, França.

uma plataforma de alumínio do tipo MB1224 Solid Aluminum Optical Breadboard® (Thorlabs, Newton, NJ, EUA), de ½ polegada de espessura, coberta por uma XE25C9D Black Hardboard® (Thorlabs, Newton, NJ, EUA), para evitar vazamento da luz laser e interferência da luz externa sobre as partes sensíveis do sistema.

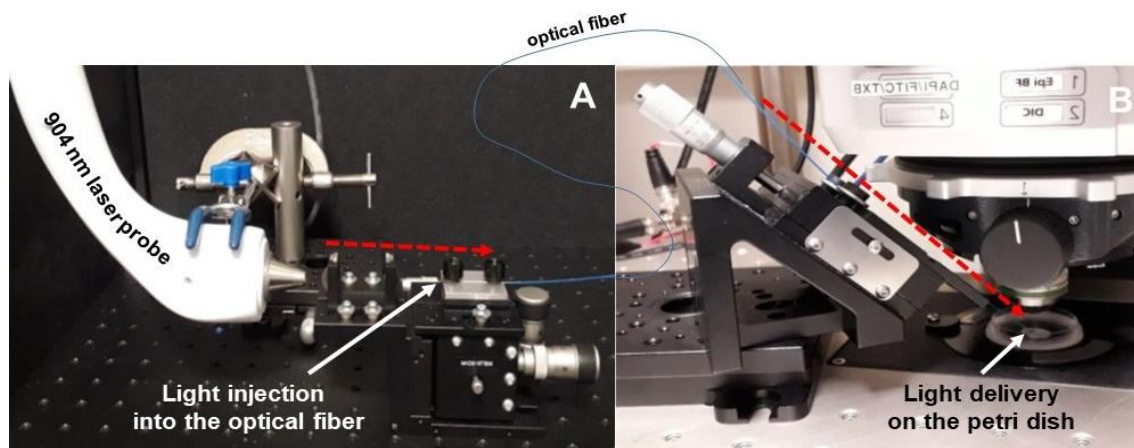


Figura 5. Sistema de fibra óptica COFS (Customized Optical Fiber System). **Painel A:** para injeção da luz infravermelha no orifício de entrada (*input*) da fibra óptica (seta branca), o laser probe (904 nm), conectado externamente ao modulador, foi firmemente posicionado com auxílio de um suporte. O conjunto de lentes côncavo e convexa, posicionadas com auxílio de um micromanipulador com a resolução de 10 μm , a 1,5 cm de distância entre si, permitiu a concentração do feixe de luz, na direção indicada pela **linha vermelha tracejada**. A fibra óptica percorreu cerca de 2 m de distância até o microscópio de fluorescência e foi posicionada perpendicularmente à placa de cultura dos neurônios do GRD, em um ângulo de 45° (**Painel B**). A distância da extremidade distal da fibra óptica (*output*) em relação aos neurônios, foi ajustada com auxílio de um micromanipulador, permitindo que a fibra óptica deslizasse no eixo indicado pela **linha vermelha tracejada**. Durante o *time lapse*, a luz infravermelha foi entregue às células com potência de aproximadamente 20 mW (seta branca). Essa configuração do sistema COFS permitiu que a aplicação da LLLT ocorresse simultaneamente ao *time lapse*, sem interferência com o laser de excitação do próprio microscópio. Fonte: Acervo do autor.

4.6 Análise da função motora dinâmica por meio do sistema CatWalk XT

Foi utilizado o equipamento CatWalk XT (Noldus Information Technology®, Wageningen, Holanda), que consiste em um sistema automatizado para análise da marcha. Por meio deste sistema, é possível mensurar parâmetros estáticos e dinâmicos referentes à impressão das pegadas (WANG *et al.*, 2008), e também detectar múltiplos parâmetros do

aparelho locomotor (BOZKURT *et al.*, 2008; BOZKURT *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2016). O sistema é composto por uma passarela de vidro sob a qual, a uma distância de 56 cm, é posicionada uma câmera de vídeo de alta velocidade, do tipo Gevicam GP-3360 (GEViCAM Inc., Milpitas, CA, EUA), equipada com uma lente grande-angular DF6HA-1B (Fujinon Corp., China). Para validação dos dados de cada corrida, os animais realizaram o percurso em um trecho calibrado de 20 x 10 cm no centro da passarela, ao atravessarem a mesma de uma extremidade a outra. Para isso, foi necessário obedecer a alguns parâmetros pré-estabelecidos, descritos na Tabela 2:

Tabela 2. Parâmetros do CatWalk XT.

Intensidade do LED verde	Varição máx. de velocidade permitida	Tempo mín. e máx. para cruzar a plataforma
0,25	60 %	0,5 e 8,0 s
Intensidade da luz vermelha (<i>ceiling</i>)	Intensidade da luz verde na plataforma	Ganho da câmera
17,8	16,5	25,01

Cada animal dos diferentes grupos experimentais foi submetido a corridas até que três delas obedecessem aos parâmetros acima estabelecidos para o experimento. A luz emitida pelo LED verde na plataforma de vidro e a luz vermelha superior (*ceiling*) formam um contraste que delimita a forma e a intensidade das pegadas dos ratos durante o contato das patas com o vidro da passarela. O software CatWalk™ XT 10.6 (Noldus Information Technology®, Wageningen, Holanda), captura automaticamente as pegadas quando o animal cruza a passarela. As capturas ocorreram com as lâmpadas da sala apagadas e sempre no mesmo período da tarde. As corridas do período pré-indução do diabetes serviram para constituir o *baseline* de cada animal. Foi considerada a média entre as três corridas obtidas de cada animal nos períodos 0, 7, 14, 21 e 28 dias após o início das injeções de STZ e tampão citrato de sódio.

Os parâmetros da marcha capturados pelo sistema CatWalk XT e considerados para o estudo foram:

-
- **Intensidades máxima e média** (*Maximum and mean intensities*) (a. u.): consiste na intensidade máxima ou média, em unidades arbitrárias, aplicada por uma determinada pata sobre a passarela de vidro;
 - **Intensidade média dos 15 pixels mais intensos** (*Mean intensity of the 15 most intense pixels*) (a. u.): este parâmetro consiste na intensidade média, em unidades arbitrárias, dos 15 pixels mais intensos de uma determinada pata;
 - **Fase de apoio da marcha** (*Stand ou stance*) (s): duração média, em segundos, do contato de uma determinada pata com a passarela de vidro;
 - **Fase de balanço da marcha** (*Swing*) (s): duração média, em segundos, do tempo em que uma determinada pata permanece em elevação, ou seja, sem contato com a passarela de vidro;
 - **Área máxima de contato** (*Maximum contact area*) (cm²): consiste na área máxima, em centímetros quadrados, ocupada por uma determinada pata quando em contato com a passarela de vidro;
 - **Área da pegada** (*Print area*) (cm²): é a superfície total, além da área ocupada pelo contato dos dígitos e face glabra, em centímetros quadrados, ocupada por uma determinada pata durante o contato com a passarela de vidro;
 - **Comprimento da passada** (*Stride length*) (cm): consiste na distância, em centímetros, entre dois posicionamentos consecutivos da mesma pata;
 - **Largura da pegada** (*Print width*) (cm): é a largura na direção vertical, em centímetros, de uma pegada completa;
 - **Ciclo do passo** (*Step cycle*) (s): consiste no tempo, em segundos, entre dois contatos iniciais da mesma pata, ou seja, o ciclo do passo é a soma do tempo das fases de apoio e balanço da marcha;
 - **Ciclo de trabalho** (*Duty cycle*) (%): este parâmetro refere-se à fase de apoio como porcentagem do ciclo do passo, ou seja, é o resultado do tempo do apoio dividido pela soma entre apoio e balanço, assim, Ciclo de trabalho (%) = Fase de apoio / (fase de apoio + fase de balanço) X 100;
 - **Apoio único** (*Single stance*) (s): é a duração, em segundos, do contato de uma única pata traseira com a passarela de vidro, ou seja, o apoio único é parte do ciclo do passo de uma determinada pata traseira quando a pata contralateral não está em contato com a passarela;

- **Início do duplo-apoio** (*Initial dual stance*) (s): consiste na duração, em segundos, do contato das duas patas traseiras com a passarela, simultaneamente. Dentro do ciclo do passo, o início do duplo-apoio é a primeira vez em que o animal faz contato com a passarela, posicionando as duas patas traseiras ao mesmo tempo;
- **Velocidade corporal** (*Body speed*) (cm/s): este parâmetro, expresso em centímetros por segundo, é calculado dividindo-se a distância que o corpo do animal percorreu a partir do contato inicial de uma pata específica até o próximo contato da mesma pata, pelo tempo utilizado para percorrer tal distância;
- **Variação da velocidade corporal** (*Body speed variation*) (%): consiste na subtração da velocidade média de uma corrida (RAS) da velocidade corporal (BS), dividido pela velocidade média (RAS), ou seja, variação da velocidade corporal = $RAS - BS / RAS$.

Parâmetros básicos das corridas, como Duração da corrida (*Run duration*) (s), Velocidade média da corrida (*Run average speed*; RAS) (cm/s), Variação máxima da corrida (*Run maximum variation*) (%), Número de passos (*Number of steps*) e Cadência da marcha (*Cadence*) (passos/segundo), também foram analisados e classificados como **Parâmetros Gerais das Corridas**. Todos os parâmetros descritos foram gerados a partir da captura das pegadas das patas traseiras (*right hindlimb*, RH; *left hindlimb*, LH) e dianteiras (*right frontlimb*, RF; *left frontlimb*, LF). Maior ênfase foi dada às patas traseiras devido ao modelo de estudo e às correlações com os testes de hiperalgesia mecânica.

4.7 Coleta dos gânglios das raízes dorsais (GRDs)

Os animais foram anestesiados com Isoflurano a 3 % (Cristália[®], Itapira, SP, Brasil) e, em seguida, exsanguinados para a dissecação e coleta dos GRDs L4 e L5, bilateralmente. As coletas aconteceram ao término do protocolo experimental, no 28º dia após o início das injeções de STZ e tampão citrato de sódio. Para o estudo *in vitro*, as coletas dos GRDs foram feitas a partir de ratos naïve, de 4 a 6 semanas de idade, sob as mesmas condições de anestesia citadas anteriormente, porém considerando de 16 a 20 GRDs por rato, a partir das regiões torácica e lombar.

4.8 Homogeneização e extração de proteínas dos GRDs

Ao término dos 28 dias do protocolo experimental, os GRDs (L4-L5) dos animais dissecados de todos os grupos (Naïve; SCB; STZ; SCB+LLLT; STZ+LLLT) foram isolados, imediatamente colocados em nitrogênio líquido (-196° C) e armazenados em temperatura de -80° C, onde permaneceram até o procedimento de homogeneização. Às amostras de GRD foi adicionado o tampão de lise RIPA (composto de ortovanadato de sódio, inibidor de protease e PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), sendo, em seguida, encaminhadas ao homogeneizador FastPrep® e agitadas por 5 vezes de 20 s, em intervalos de 5 min a 4° C. Em seguida, o material foi mantido em geladeira (4° C) por 3 h sob agitação contínua em agitador orbital. O homogenato foi centrifugado a 12000 rpm durante 15 min a 4° C. O sobrenadante foi então transferido para tubos de 0,5 mL e procedeu-se a quantificação do total de proteínas pelo método colorimétrico Bradford (BRADFORD, 1976). Alíquotas dos homogenatos foram armazenadas em freezer a -80° C até serem utilizadas para os experimentos de ELISA e Western blot.

4.9 Ensaio imuno-enzimático (ELISA) para medida de níveis de mediadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β , IL-6, CINC-1 e IL-10

Os níveis de citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, CINC-1 e IL-10 foram avaliados no período de 28 dias após o início do protocolo experimental. Para avaliação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e CINC-1, foram utilizados kits DuoSet® ELISA (R&D systems, Inc., MN, EUA), códigos DY510, DY501, DY506 e DY515, respectivamente. Placas de 96 poços foram incubadas *overnight* a 4° C com anticorpos contra as proteínas de interesse (10 μ g/mL). No dia seguinte, as placas foram lavadas e incubadas por 1 h em temperatura ambiente com uma solução a 1 % de albumina bovina no intuito de evitar ligações inespecíficas. Após esse bloqueio e lavagem das placas, a curva-padrão em várias diluições e as amostras (em duplicatas técnicas) foram adicionadas e incubadas por 2 h em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com tampão e os anticorpos policlonais biotinilados contra TNF- α , IL-1 β , IL-6 e CINC-1 de rato, diluídos a 1:2000, foram

adicionados (100 µL/poço). Após incubação em temperatura ambiente por 2 h, as placas foram novamente lavadas e 100 µL de Estreptoavidina-HRP diluída 1:200 foram adicionados. Após 20 min, as placas foram lavadas novamente e 100 µL de reagente colorido (H_2O_2 + *Tetramethylbenzidine*) foram adicionados e as placas foram mantidas no escuro, em temperatura ambiente por 20 min. A reação enzimática foi interrompida com 50 µL de H_2SO_4 (2 M) e as absorbâncias foram determinadas em 450 nm, em leitora de microplacas Asys UVM340 (Biochrom®, Cambridge, Reino Unido). Os resultados foram obtidos comparando a densidade óptica com as densidades da curva-padrão.

Para a medida dos níveis de IL-10, foi utilizado o RayBio® Rat IL-10 ELISA kit (RayBiotech, Georgia, EUA), código ELR-IL10. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente (18 – 25° C) antes do uso. Foram adicionados 100 µL de cada padrão e o mesmo volume de cada amostra nos respectivos poços, seguido por período de incubação de 2,5 h em temperatura ambiente sob leve agitação. Em seguida, a placa foi lavada 4 vezes com 1X *Wash buffer* (300 µL) e foram adicionados em cada poço 100 µL do anticorpo biotilado contra IL-10 de rato, seguido por período de incubação por 1 h em temperatura ambiente. Terminada a incubação, a placa foi novamente lavada e foram adicionados 100 µL de Estreptoavidina em cada poço. Após 45 min de incubação, foram adicionados 100 µL de TMB *One-Step Substrate Reagent*, e a placa foi deixada em temperatura ambiente e no escuro por 30 min. Ao final desta etapa, foram adicionados 50 µL de *Stop Solution* e as absorbâncias foram determinadas em 450 nm, em leitora de placas Asys UVM340 (Biochrom®, Cambridge, Reino Unido). Para as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e CINC-1, os resultados são expressos em picogramas por mililitro (pg/mL), enquanto que, para IL-10, são expressos em picogramas por mililitro por miligrama (pg/mL/mg).

4.10 Extração de RNA e síntese de cDNA a partir dos GRDs

As amostras de GRD (L4-L5) foram fragmentadas com auxílio de pistilos autoclavados e transferidas para microtubos (2 mL) (Eppendorf®, Alemanha) contendo TRIzol® (Invitrogen Life Technologies™, EUA), na proporção de 1 mL para cada 1 mg de tecido. O material foi homogeneizado com auxílio de seringas estéreis de 1 mL e agulhas

hipodérmicas (25 x 0,7) e ao homogenato foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), sendo as amostras gentilmente agitadas por 15 s. Em seguida, as amostras permaneceram em repouso por 3 min e foram centrifugadas a 12000 rpm por 15 min a 4° C, em centrífuga refrigerada (Eppendorf 5430 R®, Alemanha). A fase aquosa foi transferida para um microtubo estéril, ao qual foram adicionados 0,5 mL de álcool isopropílico (isopropanol), agitado gentilmente por 10 s e deixado 10 min em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram novamente centrifugadas a 12000 rpm por 10 min a 4° C para precipitar o RNA da fase aquosa. Ao precipitado (“*pellet*”) foi adicionado 1 mL de etanol 70 % e novamente centrifugado a 7000 rpm por 5 min a 4° C. As amostras de RNA foram suspensas em 50 µL de água DEPC e posteriormente armazenadas a -80° C. Para a determinação da concentração e da pureza do RNA, foi utilizado o espectrofotômetro de volume ultra-baixo EPOCH™ (BioTeK, Winooski, EUA), a partir da absorbância 260 nm e razões 280/260 nm e 260/230 nm. A partir do RNA total foi realizada a síntese de cDNA utilizando o SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen Life Technologies™, EUA).

Os componentes do kit de síntese de cDNA e seus respectivos volumes para cada microtubo foram: 5X VILO™ Reaction Mix (4 µL), 10X SuperScript™ Enzyme Mix (2 µL), RNA total (volume para 500 ng) e UltraPure™ DEPC-treated Water (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) para completar o volume de 20 µL. A reação foi iniciada com 10 min de incubação a 25° C, seguida por incubação a 42° C por 60 min, finalizando com 5 min de incubação a 85° C. O cDNA resultante foi diluído (1:10) e utilizado para as reações de RT-qPCR, conforme descrito no item 4.11, a seguir.

4.11 Real time polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Partindo-se de 500 ng de RNA total para a síntese de cDNA (via SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit, Invitrogen Life Technologies™, EUA), conforme descrito no item anterior (4.10), realizaram-se os experimentos de PCR em tempo-real ou PCR quantitativo (qPCR) para a análise de expressão relativa ao index de genes endógenos (VANDESOMPELE *et al.*, 2002) via método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. As reações de qPCR foram realizadas na

máquina StepOne Plus Real-Time PCR (Applied Biosystems, EUA), usando SYBR Green como sinal fluorescente (Power SYBR™ Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, EUA). Os oligonucleotídeos utilizados como iniciadores (*primers*) foram desenhados entre exons com ajuda da ferramenta "*Pick Primers*" disponível no NCBI/Primer-blast em parceria com Primer3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) e sua especificidade validada após comparação com o genoma de referência para *Rattus norvegicus* com a ferramenta BLAST.

Os *primers* aos genes que são complementares e suas sequências estão descritos na Tabela 3. Para todas as amostras submetidas à reação de RT-qPCR foram realizadas triplicatas técnicas, bem como controles negativos e calibradores interplacas para normalização dos valores de Ct.

Tabela 3. Sequência dos *primers* desenhados com auxílio da ferramenta "*Pick Primers*", disponíveis no banco de dados NCBI que foram utilizados para a reação de RT-qPCR.

<i>Gene alvo</i>	<i>Referência</i>	<i>Sequência (5'–3')</i>
p38	NM_031020.2	<i>Forward:</i> GGCTGACATAATCCACAGGG <i>Reverse:</i> CCGGTCATTTTCGTCATCAGT
JNK	NM_053829.2	<i>Forward:</i> TGCTACTTGCCAATCCCATC <i>Reverse:</i> AGATAACAGGGTGTCCGCTA
ERK1/2	NM_133283.1	<i>Forward:</i> TGTGTTTCAGCTCAGACTTCC <i>Reverse:</i> CGTTTGATGAAGGCATGGTT
Arfgef1*	NM_001277056.1	<i>Forward:</i> CAACAGGTTTAAAGCTCACGCA <i>Reverse:</i> TCCTGTTTCAGGTGGTTGTGA
Serpnb6*	NM_199085.2	<i>Forward:</i> GAGTCTAGGGTACGTTCTGCTG <i>Reverse:</i> TCCATGATGGTGAACCTGCCC

*Housekeeping/control endógeno.

4.12 Western blot para quantificação de MAPKs nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos submetidos à LLLT

Amostras do homogenato foram desnaturadas a 90° C durante 5 min. Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (1,5 mm de espessura) na presença de SDS (SDS-PAGE) para separação por eletroforese, seguindo o protocolo de Laemmli (1970) e utilizando-se do sistema Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad, EUA). Foi utilizado gel de separação de acrilamida 8 % m/v², bisacrilamida 0,3 % m/v, Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 e SDS 0,1 % m/v. O gel de concentração foi de acrilamida 4 % m/v, bisacrilamida 0,3 % m/v, Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 e SDS 0,1 % m/v. A corrida foi feita sob voltagem constante de 95 V, utilizando-se o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM e SDS 0,1 % m/v, durante aproximadamente 2 h.

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membranas de PVDF (Bio-Rad, EUA) previamente ativadas com metanol, utilizando-se o sistema de transferência Mini TransBlot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, EUA). Após o fracionamento das proteínas, o gel e a membrana de PVDF foram incubados no tampão de transferência [glicina 192 mM, Tris-Base-HCl 25 mM, pH 8,3, 20 % (v/v) de metanol e 0,1 % (m/v) de SDS] por 30 min. Posteriormente, foi montado o sistema para transferência contendo *esponja > três pedaços de papel de filtro > gel > membrana > três pedaços de papel de filtro > esponja*. As esponjas e os papéis de filtro foram previamente umedecidos no tampão de transferência. A transferência foi realizada sob voltagem constante de 95 V durante 2 h. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBST (Tris Buffered Saline, with Tween[®] 20; Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA) e o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado com uma mistura de TBST (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8, 0,05 % de Tween[®] 20) contendo 5 % (m/v) de leite em pó desnatado por 1 h sob agitação contínua. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes, 5 min cada, com TBST 0,05 % e posteriormente incubada *overnight* a 4° C com os seguintes anticorpos primários:

² m/v = massa sobre volume.

- anti-p38 MAPK Rabbit (1:1000), Cell Signaling Technology[®], código 9212;
- anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) (137F5) Rabbit mAb (1:1000), Cell Signaling Technology[®] código 4695;
- anti-JNK2 (56G8) Rabbit mAb (1:1000), Cell Signaling Technology[®] código 9258;
- anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP[®] Rabbit mAb (1:1000), Cell Signaling Technology[®] código 4511;
- anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK 1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP[®] Rabbit mAb (1:2000), Cell Signaling Technology[®] código 4370;
- anti-phospho-SAPK/JNK (Th183/Tyr185) (G9) Mouse mAb (1:2000), Cell Signaling Technology[®] código 9255.

Logo, as membranas foram lavadas 3X com TBST 0,05 %, 5 min cada, e foram incubadas durante 1 h em temperatura ambiente sob agitação contínua com o anticorpo secundário *Goat Anti-Rabbit IgG* conjugado à peroxidase (Invitrogen Life Technologies[™], EUA) (1:10000) ou *Goat Anti-Mouse IgG* conjugado à peroxidase (Jackson ImmunoResearch, PA, EUA) (1:10000).

Após a incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas 3X com TBST 0,05 %, durante 5 min cada. Para a revelação por quimioluminescência as membranas foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente com a mistura das soluções A e B do kit de quimioluminescência (ECL, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido), como descrito no manual de instruções. As membranas foram visualizadas em fotodocumentador (SYNGENE[®], Cambridge, Reino Unido), sendo as imagens capturadas com auxílio de uma câmera digital (SYNOPTICS[®], Cambridge, Reino Unido) e analisadas por meio do software Gene link (SYNGENE[®], Cambridge, Reino Unido). Em todos os experimentos de Western blot foi utilizado padrão de peso molecular (Bio-Rad, Kaleidoscope Prestained Standards, código 161-0324), como descrito na Tabela 4:

Tabela 4. Padrão de peso molecular.

<i>Myosin</i>	<i>Blue</i>	197,211
<i>B-galactosidase</i>	<i>Magenta</i>	125,275
<i>Bovine serum albumin</i>	<i>Green</i>	83,426
<i>Carbonic anhydrase</i>	<i>Violet</i>	37,095
<i>Soybean trypsin inhibitor</i>	<i>Orange</i>	31,168
<i>Lysozyme</i>	<i>Red</i>	17,154
<i>Aprotinin</i>	<i>Blue</i>	6,990

4.13 Imunofluorescência para detecção de MAPKs nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos submetidos à LLLT

Os GRDs L4-L5 foram retirados de animais anestesiados com Cetamina (i. p. 85 mg/kg) e Xilazina (i. p. 10 mg/kg), seguido pela perfusão cardíaca com solução salina de NaCl 0,9 % (200 mL) e paraformaldeído 4 % (PFA, 300 mL). Os gânglios foram então pós-fixados por 1 h em PFA 4 % e desidratados em solução de sacarose 30 % por 48 h, ou até que submergissem na solução. Foram feitos cortes de 14 µm em criostato (Leica Biosystems, Alemanha) utilizando lâminas gelatinizadas.

Para reação imune, os tecidos foram incubados por 30 min em PBS contendo Glicina (0,1 M) para inativar os aldeídos livres presentes no PFA. Foi realizado um bloqueio com Albumina Sérica Bovina (BSA) 2 % e permeabilização com Triton X-100 0,2 % por 1 h e os anticorpos primários foram incubados em solução PBS contendo Triton X-100 0,1 % e BSA 1 % por 2 h em temperatura ambiente ou *overnight* a 4° C, dependendo do anticorpo³. Após incubação, os tecidos foram lavados uma vez por 5 min com a mesma solução usada para incubação do anticorpo primário e em seguida lavados 5 vezes, 5 min cada, com PBS. Os anticorpos secundários foram incubados por 1 h em solução igual à utilizada para incubação dos anticorpos primários. Após a incubação, os cortes ou culturas foram então lavados 5 vezes, 5 min cada, em PBS.

³ Para a imunofluorescência destinada a identificação de p-ERK1/2 e p-JNK, antes da etapa de bloqueio com albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*; BSA) a 2 % e permeabilização com Triton X-100 (0,3 %) por 1 h, foi realizada permeabilização com metanol 100 % a temperatura de -20° C.

Ao final, os tecidos foram incubados por 10 min com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 0,25 µg/mL; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA; D9542) diluído em PBS e as lâminas foram montadas em Vectashield® (Vector Laboratories, EUA) e seladas com esmalte para unhas. Controles negativos foram preparados sem a incubação dos anticorpos primários para confirmar que não houve ligações inespecíficas dos anticorpos secundários. As imagens foram inicialmente observadas em microscópio de fluorescência comum e depois fotografadas em microscópio confocal invertido Zeiss Axio Observer Z1 LSM780-NLO (Carl Zeiss AG, Alemanha) com auxílio das objetivas EC Plan-Neofluar 20x/0.50 Dry e EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC.

4.13.1 Anticorpos utilizados

Para a marcação das MAPKs (p-p38, p-ERK1/2 e p-JNK) por imunofluorescência, foram utilizados os anticorpos primários para as formas fosforiladas, nas respectivas concentrações:

- anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP® Rabbit mAb (1:500), Cell Signaling Technology®, código 4511;
- anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK 1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP® Rabbit mAb (1:200), Cell Signaling Technology®, código 4370;
- anti-phospho-SAPK/JNK (Th183/Tyr185) (G9) Mouse mAb (1:400), Cell Signaling Technology®, código 9255.

Como anticorpo secundário, foi utilizado o Invitrogen™ Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (1:1000), código A21206 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

4.14 Espectroscopia Raman dos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos hiperalgésicos submetidos ao tratamento com LLLT

No 28º dia do protocolo experimental, os GRDs L4-L5 foram extraídos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido (-196,15° C), no qual foram mantidos até o

momento da análise. Os espectros Raman foram obtidos a partir de um único GRD por rato, aleatoriamente escolhido entre L4-L5, totalizando oito GRDs por grupo. Para a análise, os GRDs foram removidos do nitrogênio líquido e mantidos em temperatura ambiente por cerca de 5 minutos antes do início das medidas. A leitura dos espectros Raman foi realizada em triplicatas técnicas, resultando em 24 espectros por grupo, em um aparelho *LabRam Aramis Instrument* (Horiba Jobin-Yvon, Kyoto, Japão), por meio do laser $\lambda = 532$ nm, objetiva de 100X, grade de 1800 gr/mm, filtro a 10 % e abertura de 100 μm , a partir de um ponto plano, centralmente localizado no gânglio íntegro, o qual foi posicionado sobre uma lâmina de silício. Os dados espectrais foram exportados para um microcomputador e foram realizadas correções da linha de base por meio de um código ALSS (*Asymmetric Least Squares Smoothing*), executado em Spyder (Python 3.6, Python Software Foundation, <https://www.python.org/>). Os picos foram plotados em gráfico que consiste de eixo X – deslocamento Raman (*Raman shift*; cm^{-1}) – e intensidade arbitrária, eixo Y (*intensity*; a. u.).

4.15 Cultura primária de neurônios do GRD

A cultura primária de neurônios do GRD foi realizada conforme o protocolo descrito por Linhart e colaboradores (2003) e utilizado por nosso grupo de pesquisa (MANZO *et al.*, 2017; do PRADO *et al.*, 2020). Ratos Lewis isogênicos (*Rattus norvegicus*; LEW/HsdUnib), machos, ~ 200 g, foram eutanasiados por aprofundamento em anestesia inalatória por Isoflurano (Cristália®, Itapira, SP, Brasil) seguida por decapitação. Em seguida, os GRDs das regiões lombar e torácica foram removidos (16 a 20 gânglios por animal), dissecados e colocados em solução salina de Hank's (HBSS) estéril com 10 mM de tampão HEPES. As células foram dissociadas por incubação a 37° C durante 60 min em solução salina de Hank's (HBSS), contendo 0,28 U/mL de collagenase (tipo 2, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), seguida por 6 min de incubação a 37° C em solução contendo 0,25 mg/mL de tripsina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). Os GRDs foram lavados em meio de cultura (DMEM, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil), 50 U/mL de penicilina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e 50 mg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®, St. Louis,

MO, EUA). As células foram então dissociadas mecanicamente e cultivadas em placas cobertas com laminina e poli-D-lisina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), mantidas em atmosfera de CO₂ 5 % a 37° C.

As placas de cultura foram divididas em 2 grupos: o primeiro grupo recebeu meio de cultura (DMEM, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) suplementado com glicose (D-(+) Glucose, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) a 5,5 mM (normoglicêmico, grupo *Low-glucose*) e o segundo grupo recebeu meio de cultura (DMEM, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) suplementado com glicose (D-(+) Glucose, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) a 55 mM (hiperglicêmico, grupo *High-glucose*). Este último, mimetizando (*in vitro*) a condição hiperglicêmica do diabetes mellitus tipo 1.

4.16 Avaliação da dinâmica de cálcio intracelular (*long-term response*): experimentos *ex vivo* e *in vitro*

*4.16.1 Dinâmica de cálcio intracelular: experimento *ex vivo**

Para esta análise, a cultura primária de GRD foi realizada de acordo com o protocolo descrito no item 4.15, a partir de GRDs L4-L5 coletados de ratos dos grupos SCB, STZ e STZ+LLL, no 28° dia do protocolo experimental. As células foram plaqueadas (200 µL por placa) sobre lamínulas de borossilicato Nunc™ Thermanox™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), de 25 mm de diâmetro. Após 24 h de cultura em meio convencional (5,5 mM de glicose), os conjuntos placa-lamínula foram lavados em tampão Hank's (HBSS) contendo 10 mM de HEPES (pH 7,4) e as células foram incubadas com 10 µM do indicador de cálcio intracelular Molecular Probes™ Fluo-4, AM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e 1 % de PowerLoad™ Concentrate, 100X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), por 40 min em estufa a 37° C, CO₂ 5 %.

As placas de cultura incubadas com Fluo-4, AM, foram então lavadas 3X em tampão Hank's (HBSS) e as lamínulas foram removidas e inseridas em uma câmara de perfusão (Warner Instruments, EUA) conectada a um sistema de válvulas (Warner Instruments, EUA) controlado por microcomputador. A câmara de perfusão foi então acoplada ao microscópio de fluorescência invertido DMI6000 B (Leica Microsystems®, Alemanha). O sistema de válvulas

permitiu a perfusão dos neurônios do GRD com Hank's (HBSS) em diferentes concentrações de KCl (5 mM, basal; 15 mM, estímulo parcial; 50 mM, estímulo máximo). O fluxo de Hank's (HBSS) pela câmara de perfusão foi ajustado para 5 mL/min, permitindo a total substituição do volume intracâmara a cada 2 s.

A fluorescência emitida pelos neurônios do GRD, atribuída à ligação do cálcio intracelular ao Fluo-4, AM, foi avaliada em séries temporais de imagens (*time lapse*, 1 imagem/s), obtidas por meio de microscopia epifluorescente (Leica Microsystems®, Alemanha), excitação de 480 nm e supressão de 527/30 nm. Os valores de fluorescência referem-se a $\Delta F/F_0$, ou seja, a variação de intensidade de fluorescência $\Delta F = F - F_0$ dividida pela fluorescência basal (F_0), de forma a normalizar as variações de concentração do indicador fluorescente nas células. A fluorescência basal (F_0) foi determinada pela fluorescência total observada no 2º s do *time lapse*, sendo que o 1º s foi removido devido às alterações de foco na primeira imagem obtida.

4.16.2 Dinâmica de cálcio intracelular: experimento *in vitro*

Para o experimento *in vitro*, a cultura primária de GRD foi realizada de acordo com o protocolo descrito no item 4.15, e as células foram plaqueadas (200 µL por placa) sobre lamínulas de borossilicato Nunc™ Thermanox™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), de 25 mm de diâmetro. Após 24 h de cultura em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose, grupo *Low-glucose*) ou hiperglicêmico (55 mM de glicose, grupo *High-glucose*), as células foram expostas à LLLT, AsGa (904 nm), 2,03 J, por 29 s, utilizando a técnica de varredura (*swiping motion*) em contato indireto com o meio (grupos *Low-glucose+LLLT* e *High-glucose+LLLT*). Imediatamente após a LLLT, os conjuntos placa-lamínula foram lavados em tampão Hank's (HBSS) contendo 10 mM de HEPES (pH 7,4) e as células foram incubadas com 10 µM do indicador de cálcio intracelular Molecular Probes™ Fluo-4, AM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e 1 % de PowerLoad™ Concentrate, 100X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), por 40 min em estufa a 37° C, CO₂ 5 %. As etapas seguintes foram realizadas exatamente como descrito para o experimento *ex vivo* (item 4.16.1).

4.17 Potencial de membrana mitocondrial (MMP) dos neurônios do GRD por TMRE (Tetramethylrhodamine, ethyl ester) (*fast-term response*)

Para esta análise, as culturas primárias de GRD foram realizadas de acordo com o protocolo descrito no item 4.15, em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose; grupo *Low-glucose*) ou hiperglicêmico (55 mM de glicose; grupo *High-glucose*). Após 24 h em cultura, os respectivos meios (DMEM) foram removidos e as placas foram lavadas 2X com PBS estéril a temperatura de 37° C. Em seguida, as células foram incubadas com 500 nM de Tetramethylrhodamine, ethyl ester⁴ (TMRE; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), diluído em solução fisiológica LCIS (Live Cell Imaging Solution, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), suplementado com glicose (D-(+) Glucose, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) nas mesmas concentrações em que os neurônios do GRD foram incubados durante 24 h em DMEM (5,5 ou 55 mM de glicose).

Foram utilizados controles-positivo e negativo do MMP, consistindo em estímulo ou inibição dos complexos mitocondriais, respectivamente. Como controle positivo foi utilizado um desacoplador mitocondrial, 2,4-dinitrophenol (DNP, 20 µM; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e para controle negativo foram utilizados Rotenona (ROT, 5 µM; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), inibidor do complexo mitocondrial I, e Antimicina A (*from Streptomyces sp.*) (AMA, 5 µM; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), inibidor do complexo mitocondrial III. DNP ou ROT e AMA foram adicionados à solução de LCIS+TMRE e incubados em estufa à 37° C com 5 % de CO₂ atmosférico, por 30 min. Após a incubação, as culturas primárias de GRD foram imediatamente levadas ao microscópio de fluorescência Zeiss Axio Examiner A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemanha) para aquisição de imagens em *time lapse*.

Neste experimento, a LLLT foi aplicada por meio do sistema de fibra óptica COFS (*customized optical fiber system*), especialmente desenvolvido para este trabalho, conforme descrito no item 4.5.2.1, compondo os grupos *Low-glucose+LLLT* e *High-glucose+LLLT*. A LLLT foi aplicada após 360 e 720 segundos de *time lapse*, por meio de injeção da luz laser [AsGa (904 nm), 2,03 J, 70 mW de potência de entrada (*input*) e ~ 20 mW de potência de

⁴ O TMRE consiste em um corante fluorescente vermelho-laranja, catiônico, permeante celular, facilmente sequestrado pelas mitocôndrias quando estas encontram-se em estado ativo.

saída (*output*), durante 29 s], no sistema de fibra óptica. As imagens foram obtidas com auxílio do software MetaMorph Advanced v.7.7.0.0 (Molecular Devices, Foster City, CA, EUA), constando de 1 imagem/s, durante 20 min, com excitação de 550 nm, tempo de exposição de 500 ms, *binning* 2x2 e lente objetiva de 20X. Os conjuntos de imagens (*stacks*) foram analisados com auxílio do software ImageJ (*National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland, EUA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018).

4.18 Potencial de membrana dos neurônios do GRD por FluoVolt™ Membrane Potential Probe (*ultra fast-term response*)

Para investigar opticamente as alterações do potencial de membrana dos neurônios do GRD, foi utilizado FluoVolt™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), que consiste de um corante sensível a voltagem (*ultra fast-responding voltage-sensitive dye*), com resolução de sub-milissegundos e alta magnitude de emissão de fluorescência. A magnitude de fluorescência dependente do potencial de membrana varia entre 2–10 % para cada 100 mV de despolarização da membrana celular.

Após 24 h de cultura celular de GRD em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose; grupo *Low-glucose*) ou hiperglicêmico (55 mM de glicose; grupo *High-glucose*) (D-(+) Glucose, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), o meio de cultura (DMEM) foi substituído por solução fisiológica LCIS (Live Cell Imaging Solution, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), suplementada com FluoVolt™ (1:1000× em DMSO) e com PowerLoad™ Concentrate⁵ (1:100×) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), por 30 min no escuro, em temperatura ambiente. À solução LCIS, foi previamente adicionada glicose (D-(+) Glucose, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), nas mesmas concentrações do meio (DMEM) em que os neurônios do GRD foram incubados durante 24 h (5,5 ou 55 mM de glicose). Após 30 min de incubação, o FluoVolt™ foi removido e as células foram lavadas 2X com LCIS. Às culturas, foi adicionado 1 mL de LCIS para aquisição das imagens de fluorescência. O *time lapse* foi realizado durante 20 min por placa de cultura, 1 imagem/s, com aplicação da LLLT após 360 e 720 s, durante 29 s (2,03 J), por meio do sistema COFS

⁵ O PowerLoad™ Concentrate, que compõe o FluoVolt™ Kit, é uma formulação otimizada de PSP (*pluronic surfactant polyols*), que ajuda na solubilização do corante.

(ver item 4.5.2.1), nos grupos *Low-glucose+LLLT* e *High-glucose+LLLT*. Os parâmetros para microscopia foram: 490/500 nm de excitação/iluminação; objetiva de 20X; *binning* de 2x2; tempo de exposição de 200 ms; intensidade do LED em 10 %. As imagens foram adquiridas por meio do software MetaMorph Advanced v.7.7.0.0 (Molecular Devices, Foster City, CA, EUA) e analisadas com auxílio do software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018).

4.19 Patch clamp *whole-cell* dos neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT

O experimento de Patch clamp *whole-cell* foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Gong, Ohara e Jasmin (2016). As medidas do potencial de membrana dos neurônios do GRD foram feitas em neurônios aferentes primários, mantidos em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose; grupo *Low-glucose*) ou hiperglicêmico (55 mM de glicose; grupo *High-glucose*) por 24 h. As gravações foram realizadas por meio do amplificador EPC 10 USB Patch clamp amplifier (HEKA Instruments Inc., Holliston, MA, EUA), configurado para o modo “*voltage*”. As pipetas de vidro foram preparadas com auxílio de um *puller* horizontal MP100® (Sutter Instrument, Novato, CA, EUA) e foi utilizada a seguinte solução intra-pipeta: KCl 10 mM; Kgluconato 130 mM; HEPES 10 mM; MgCl₂*6H₂O 2 mM; MgATP 2 mM; Na₂GTP 0,5 mM. Uma vez preenchida com a solução, a resistência da pipeta em contato com a membrana neuronal foi mantida em 6 MΩ. A aquisição do potencial de membrana foi realizada a cada 2.10⁻⁵ s (50 kHz) e 5.10⁻⁵ s (20 kHz). Uma corrente de -587 pA foi injetada continuamente para manter o potencial de membrana a -60 mV, aproximadamente. Inicialmente, foram realizadas as medidas do potencial de repouso da membrana neuronal (*resting membrane potential*, RMP) e aplicados pulsos de corrente quadrada (*square current pulses*) para encontrar a reobase, que consiste na menor intensidade de corrente suficiente para deflagar um potencial de ação.

4.20 Ensaio de viabilidade celular por MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]}

As culturas primárias de GRD foram realizadas de acordo com o protocolo descrito no item 4.15, em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose) ou hiperglicêmico (55 mM de glicose). Para esta análise, as células (3×10^4) foram plaqueadas em placas de 96 poços Nunc™ MicroWell™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e divididas em 6 grupos, cada grupo ocupando 8 poços:

- **Low-glucose:** células mantidas por 24 h em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose), sem exposição à LLLT;
- **Low-glucose+DMSO:** células mantidas por 24 h em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose) e em seguida tratadas com 100 µL de dimetilsulfóxido (14,1 M) (DMSO, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), sem exposição à LLLT;
- **Low-glucose+LLLT:** células mantidas por 24 h em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose) e em seguida expostas ao laser AsGa (904 nm), 2,03 J, 29 s, um ponto por poço, contato indireto;
- **High-glucose:** células mantidas por 24 h em meio hiperglicêmico (55 mM de glicose), sem exposição à LLLT;
- **High-glucose+DMSO:** células mantidas por 24 h em meio hiperglicêmico (55 mM de glicose) e em seguida tratadas com 100 µL de dimetilsulfóxido (14,1 M) (DMSO, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), sem exposição à LLLT;
- **High-glucose+LLLT:** células mantidas por 24 h em meio hiperglicêmico (55 mM de glicose) e em seguida expostas ao laser AsGa (904 nm), 2,03 J, 29 s, um ponto por poço, contato indireto.

Após os respectivos tratamentos (DMSO ou LLLT), o meio de cultura (DMEM) foi removido e cada poço foi lavado 2X com 200 µL de PBS estéril a temperatura de 37° C. Em seguida, cada poço recebeu 100 µL de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]} (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), na concentração de 0,5 mg/mL, seguido por período de incubação de 2 h. Após este período, o MTT foi substituído por 100 µL de DMSO puro (14,1 M) e a placa foi agitada por 5 min, seguidos de 5 min em repouso

para estabilização da cor. A leitura da placa foi realizada em 540 nm, em leitora Asys UVM340 (Biochrom®, Cambridge, Reino Unido).

O mesmo protocolo foi utilizado para a realização do experimento de MTT após 48, 72, 96 e 120 h (*time course*) de cultura de GRD em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose) ou hiperglicêmico (55 mM de glicose). Neste caso, foi utilizada uma placa de 96 poços Nunc™ MicroWell™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) para cada período. O meio de cultura (DMEM) foi trocado a cada 24 h e a LLLT foi aplicada diariamente nos grupos *Low-glucose+LLLT* e *High-glucose+LLLT*, sempre no período da tarde, assim como os tratamentos com DMSO (grupos *Low-glucose+DMSO* e *High-glucose+DMSO*). As células em cultura por 24 h receberam 1 exposição à LLLT. Em 48 horas somaram-se 2 exposições com intervalos de 24 h entre cada uma e assim, sucessivamente, até o máximo de 5 exposições, relativas à placa de 120 h (5 dias).

4.21 Análises estatísticas

As análises entre três ou mais grupos experimentais foram submetidas ao teste de variância ANOVA *Two-way* (quando há a variável tempo) ou *One-way*, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As análises entre apenas dois grupos foram realizadas por meio do teste-t não-pareado. Análises de correlação foram realizadas por meio do teste PCC (*Pearson's Correlation Coefficients*). Para todas as análises foram considerados valores de $p < 0,05$ como estatisticamente significativos (nível de significância de 95 %). Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Os testes estatísticos foram aplicados com auxílio do programa GraphPad Prism, Versões 5, 7 e 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). A análise de PCA (*Principal Component Analysis*) foi realizada por meio do software OriginPro 2019 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA) e a análise de LDA (*Linear Discriminant Analysis*) foi implementada por meio do pacote *scikit-learn* (<https://scikit-learn.org/stable/index.html>), executado em linguagem de programação Python.

5 RESULTADOS

5.1 Eficácia da indução do diabetes tipo I por múltiplas doses de estreptozotocina (STZ)

O protocolo de indução do diabetes tipo I por múltiplas doses de STZ mostrou-se eficaz para o desenvolvimento da hiperglicemia. Todos os animais que receberam as injeções de STZ tornaram-se diabéticos após as cinco injeções (glicose plasmática ≥ 250 mg/dL). Animais que receberam injeções do veículo da STZ (tampão citrato de sódio, 0,1 M) não apresentaram alterações na glicemia plasmática (Figura 6, Painel A). Nenhum animal foi a óbito durante a execução dos procedimentos experimentais. Não houve reversão do diabetes, de modo que os animais se mantiveram hiperglicêmicos no decorrer das quatro semanas de experimento (Figura 6, Painel B). Outros sinais clínicos do diabetes mellitus tipo I foram observados, como, por exemplo, poliúria, polifagia, polidipsia e interrupção no ganho de peso. Destes, os dois últimos também foram analisados e os dados são mostrados na Figura 6 (Painéis C, D e E), a seguir.

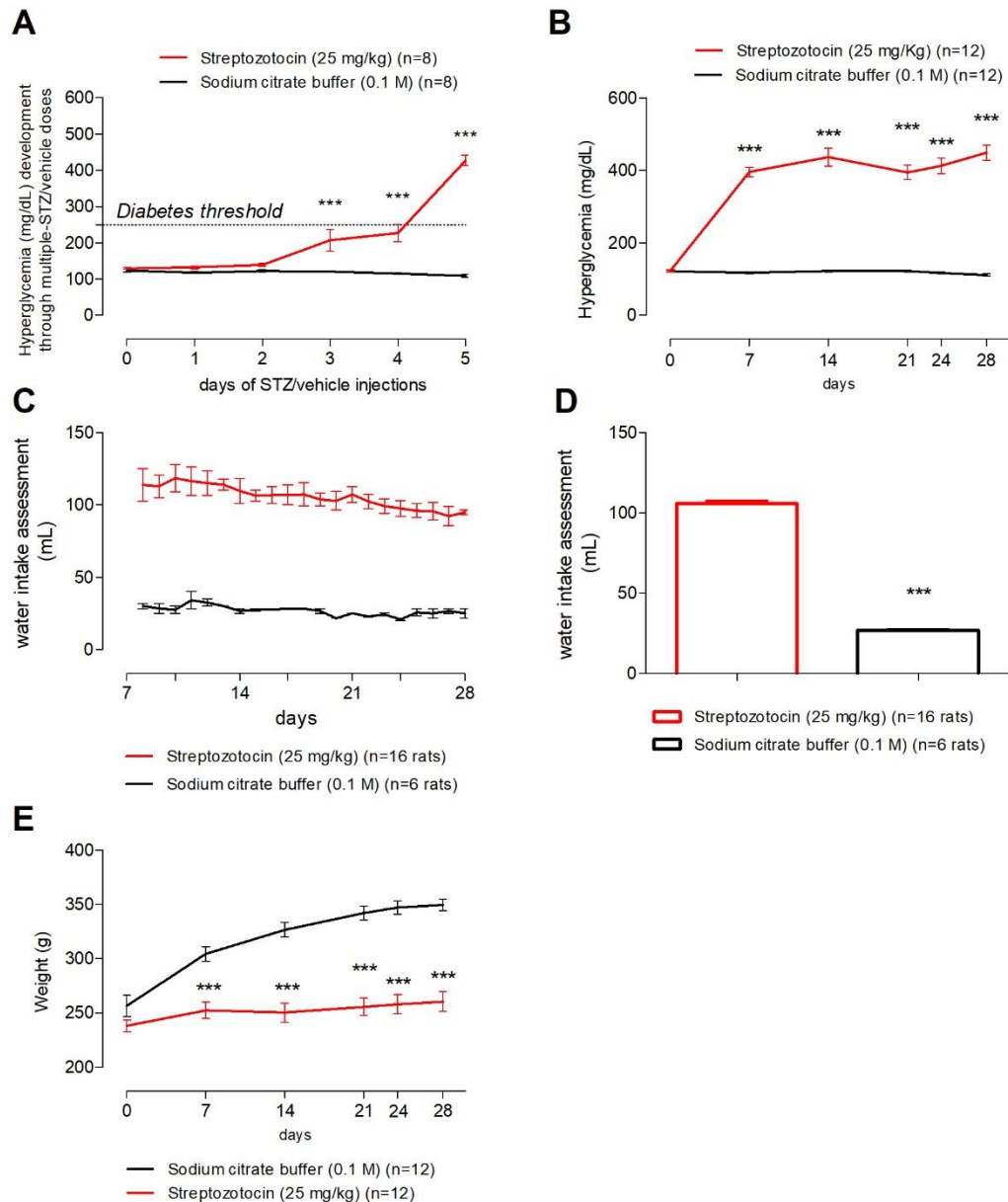


Figura 6. Desenvolvimento dos sinais clínicos do diabetes mellitus tipo I induzido por múltiplas doses de STZ. Painei A: O gráfico apresenta a glicemia matinal média de animais ($n = 8$) a cada dia do protocolo de múltiplas doses de STZ (25 mg/kg/dia) (linha vermelha) e veículo (tampão citrato de sódio, 0,1 M) (linha preta). A medida foi realizada a partir de punção venosa caudal, 30 minutos após a injeção de STZ ou veículo, uma vez ao dia, durante cinco dias consecutivos. A partir do quarto dia, os animais atingiram o limiar de glicemia plasmática (*diabetes threshold*; linha pontilhada horizontal) estabelecido para o diabetes (250 mg/dL). No quinto dia, os animais atingiram um nível de glicemia cerca de 4 vezes maior do que o basal. **Painei B:** O gráfico apresenta a manutenção do diabetes, caracterizado pela presença de hiperglicemia até o 28º dia do

protocolo experimental. A hiperglicemia foi aferida nos períodos 7, 14, 21, 24 e 28 dias após o início das injeções de STZ ou veículo. O símbolo (***) representa diferença significativa ($p < 0,001$) entre a glicemia plasmática dos animais diabéticos (**linha vermelha**) em comparação aos animais controle (**linha preta**). ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. **Painel C:** medida do consumo diário de água (*water intake*), em mL, de animais diabéticos (**linha vermelha**) e controles (**linha preta**), iniciada em 48 h após o término do protocolo de múltiplas doses de STZ e veículo. Animais diabéticos consumiram cerca de 4 vezes mais água em comparação aos animais controle. **Painel D:** gráfico em barras comparando o consumo de água diário médio, durante os 21 dias analisados, entre animais diabéticos (**barra vermelha**) e controles (**barra preta**). O símbolo (***) representa diferença significativa ($p < 0,001$) entre os animais diabéticos e controle. ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. **Painel E:** gráfico demonstrando interrupção no ganho de peso em animais diabéticos (**linha vermelha**) em comparação aos animais controle (**linha preta**), com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$), a partir do 7º dia do protocolo experimental, representada pelo símbolo (***). ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.2 Efeitos da LLLT sobre a hiperglicemia e a massa corpórea dos animais durante o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica induzida por STZ

5.2.1 Hiperglicemia

No protocolo inicial, o tratamento com LLLT (grupos STZ+LLLT 2.03 J; STZ+LLLT 4.06 J; STZ+LLLT 8.12 J e SCB+LLLT 2.03 J; SCB+LLLT 4.06 J; SCB+LLLT 8.12 J) foi realizado diariamente, a partir do 7º dia após a primeira injeção de STZ (25 mg/kg) ou veículo (tampão citrato de sódio; 0,1 M), até o 28º dia do protocolo experimental, conforme mostrado no esquema da Figura 7. As medidas da glicemia plasmática e massa corpórea foram realizadas nos dias 0, 7, 14, 21, 24 e 28 após o início das injeções de STZ ou veículo.

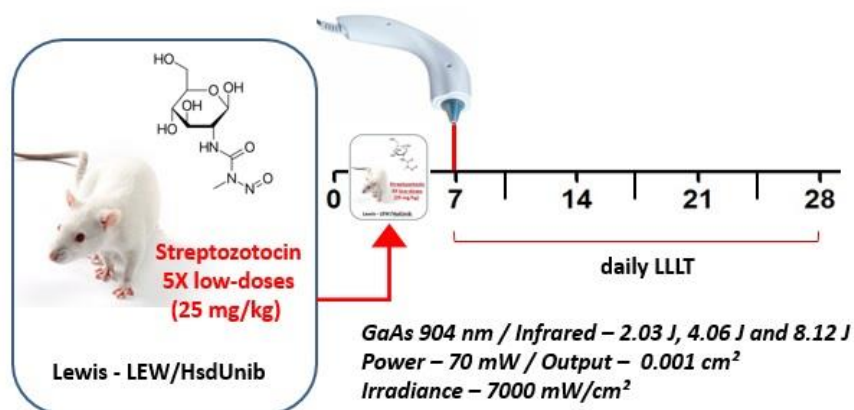


Figura 7. Esquema representativo do protocolo experimental utilizado para estudo dos efeitos da LLLT durante o desenvolvimento da neuropatia diabética. Ratos Lewis isogênicos, machos, 4-8 semanas de idade, 200-250 g, receberam 5 injeções intraperitoneais de STZ (25 mg/kg) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) ou veículo (tampão citrato de sódio 0,1 M), 1 injeção por dia, durante 5 dias consecutivos. Na etapa inicial do estudo, o tratamento com LLLT foi realizado diariamente após o estabelecimento do diabetes, ou seja, com início no 7º dia até o 28º dia após o início das injeções de STZ. As análises comportamentais e as medidas de glicemia plasmática e massa corpórea foram realizadas nos dias 0, 7, 14, 21, 24 e 28 do protocolo experimental. No 28º dia, os animais foram eutanasiados.

No 7º dia (48 h após a última injeção de STZ ou veículo), os animais que receberam as injeções de STZ apresentaram valores de glicemia superiores ao limiar considerado para o diabetes (250 mg/dL). Em seguida, os animais diabéticos foram divididos em quatro grupos: STZ (n = 8); STZ+LLLT 2.03 J (n = 8); STZ+LLLT 4.06 J (n = 8); STZ+LLLT 8.12 J (n = 8). Os grupos tratados foram submetidos à LLLT diariamente, entre o 7º e o 28º dia do protocolo experimental. A hiperglicemia dos animais que receberam as injeções de STZ manteve-se constante até o 28º dia, apresentando valores médios de glicose plasmática de 471,78 mg/dL $\pm$ 66,15 mg/dL. Os níveis glicêmicos dos animais que receberam injeções do veículo (tampão citrato de sódio; 0,1 M) (grupos SCB, SCB+LLLT 2.03 J, SCB+LLLT 4.06 J e SCB+LLLT 8.12 J) e de animais do grupo Naïve, não se alteraram no decorrer das semanas, sendo significativamente inferiores ($p < 0,001$; ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) quando comparados aos de animais pertencentes aos grupos STZ, STZ+LLLT 2.03 J, STZ+LLLT 4.06 J e STZ+LLLT 8.12 J. A LLLT, aplicada diariamente, não

apresentou efeito sobre os valores de glicemia plasmática para as doses de energia aplicadas (2,03 J; 4,06 J; 8,12 J), conforme observado na Figura 8.

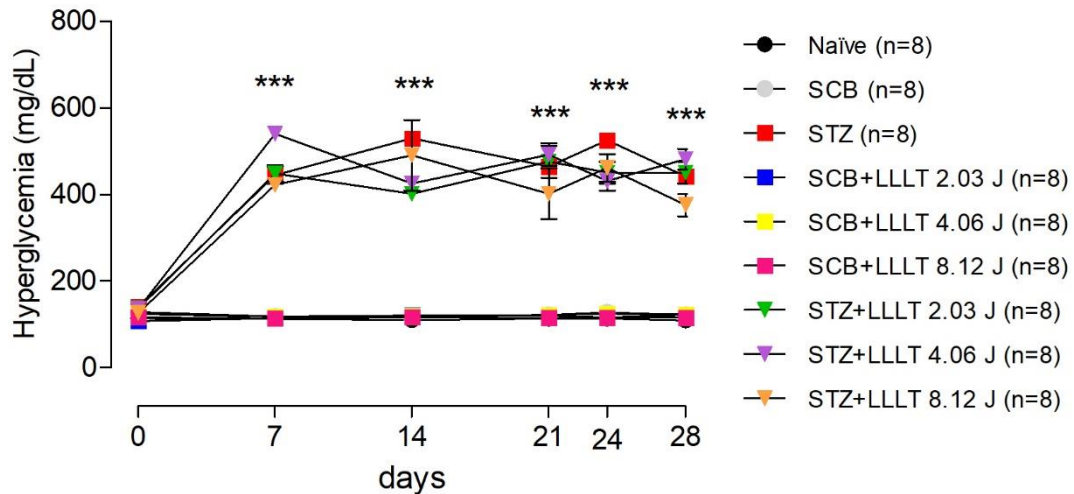


Figura 8. Efeito da LLLT sobre a hiperglicemia induzida por múltiplas doses de STZ durante o desenvolvimento da neuropatia diabética. A LLLT foi aplicada diariamente a partir do 7º dia após a primeira injeção de STZ ou veículo, até o 28º dia do protocolo experimental. O tratamento não influenciou os níveis de glicemia plasmática no decorrer das semanas. Os animais que receberam as injeções de STZ [grupos STZ (**quadrados vermelhos**); STZ+LLLTT 2.03 J (**triângulos verdes**); STZ+LLLTT 4.06 J (**triângulos violetas**); STZ+LLLTT 8.12 J (**triângulos laranjas**)] mantiveram-se em valores constantes de hiperglicemia até o 28º dia e diferiram significativamente ($p < 0,001$) daqueles que receberam injeções do veículo, tampão citrato de sódio 0,1 M [grupos SCB (**círculos cinzas**); SCB+LLLTT 2.03 J (**quadrados azuis**); SCB+LLLTT 4.06 J (**quadrados amarelos**); SCB+LLLTT 8.12 J (**quadrados cor-de-rosa**)]. ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolo (***) representa $p < 0,001$. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.2.2 Massa corpórea

Os animais que receberam injeção de veículo (tampão citrato de sódio 0,1 M; grupos SCB; SCB+LLLTT 2.03 J; SCB+LLLTT 4.06 J; SCB+LLLTT 8.12 J) e animais do grupo Naïve, apresentaram ganho de peso, de maneira gradual no decorrer das semanas, diferentemente ($p < 0,001$; ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) dos animais diabéticos, com ou sem tratamento com LLLT (grupos STZ; STZ+LLLTT 2.03 J; STZ+LLLTT 4.06 J; STZ+LLLTT 8.12 J). Os animais diabéticos mantiveram a massa corpórea em valores similares

aos observados no período pré-injeção de STZ, com leve perda de peso no decorrer das semanas, conforme demonstrado no gráfico da Figura 9.

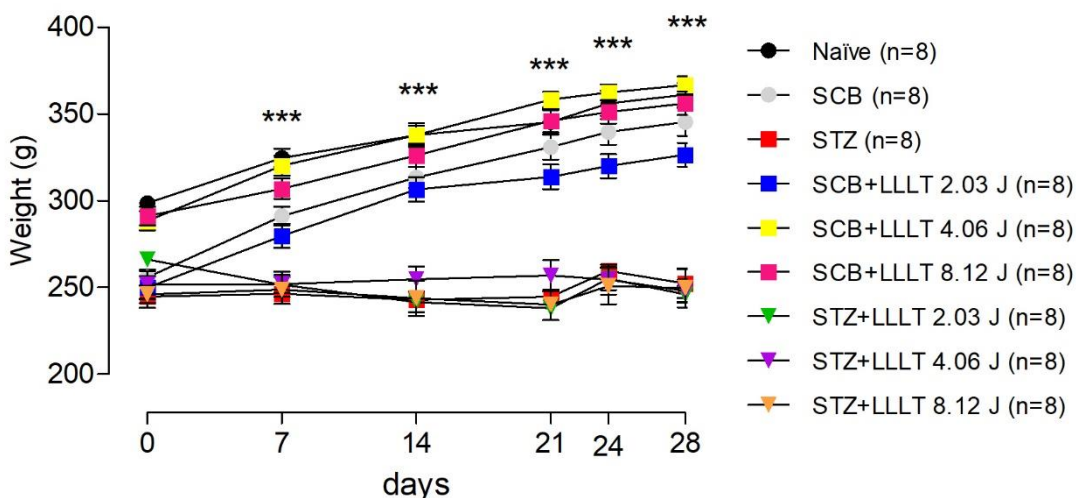


Figura 9. Efeito da LLLT sobre a massa corpórea dos animais durante o desenvolvimento da neuropatia diabética. A LLLT foi aplicada diariamente, a partir do 7º dia após a primeira injeção de STZ ou veículo, até o 28º dia do protocolo experimental. Os animais que receberam injeção do veículo (tampão citrato de sódio; 0,1 M) [grupos SCB (círculos cinzas); SCB+LLLT 2.03 J (quadrados azuis); SCB+LLLT 4.06 J (quadrados amarelos); SCB+LLLT 8.12 J (quadrados cor-de-rosa)], ganharam peso de maneira significativa ($p < 0,001$) no decorrer das semanas, em comparação aos animais diabéticos, com ou sem tratamento [grupos STZ (quadrados vermelhos); STZ+LLLT 2.03 J (triângulos verdes); STZ+LLLT 4.06 J (triângulos violetas); STZ+LLLT 8.12 J (triângulos laranjas)]. ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolo (***) representa $p < 0,001$. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.3 Efeito anti-hiperalgésico da LLLT durante o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica induzida por STZ

Como descrito anteriormente, no protocolo inicial a LLLT foi aplicada a partir do 7º dia após a primeira injeção de STZ (25 mg/kg/dia) ou veículo (tampão citrato de sódio, 0,1 M). A partir do 14º dia foram observadas as primeiras alterações no limiar de retirada da pata, avaliado pelo teste Randall-Selitto, caracterizando o início da hiperalgesia mecânica como um sintoma da neuropatia diabética periférica. Já no 14º dia, o tratamento com LLLT, especialmente nas doses de 2,03 J e 4,06 J (grupos STZ+LLLT 2.03 J e STZ+LLLT 4.06 J,

respectivamente), foi capaz de manter a intensidade de hiperalgesia em valores próximos aos observados no 7º dia (período em que não houve hiperalgesia mecânica). Ainda, houve redução significativa da intensidade de hiperalgesia nos grupos STZ+LLLT 2.03 J e STZ+LLLT 4.06 J, quando comparados grupo STZ, sem tratamento ($p < 0,001$; ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) no mesmo período (14 dias). Nos períodos subsequentes (21, 24 e 28 dias após a primeira injeção de STZ ou veículo), o tratamento com LLLT, nas doses de 2,03 J e 4,06 J (grupos STZ+LLLT 2.03 J e STZ+LLLT 4.06 J, respectivamente), foi capaz de manter a intensidade de hiperalgesia mecânica em valores significativamente inferiores aos observados nos animais neuropáticos sem tratamento (grupo STZ). A dose de 2,03 J (grupo STZ+LLLT 2.03 J) foi ainda mais eficaz na redução da hiperalgesia mecânica, quando comparada às demais (4,06 J e 8,12 J; grupos STZ+LLLT 4.06 J e STZ+LLLT 8.12 J, respectivamente), conforme observado no gráfico da Figura 10.

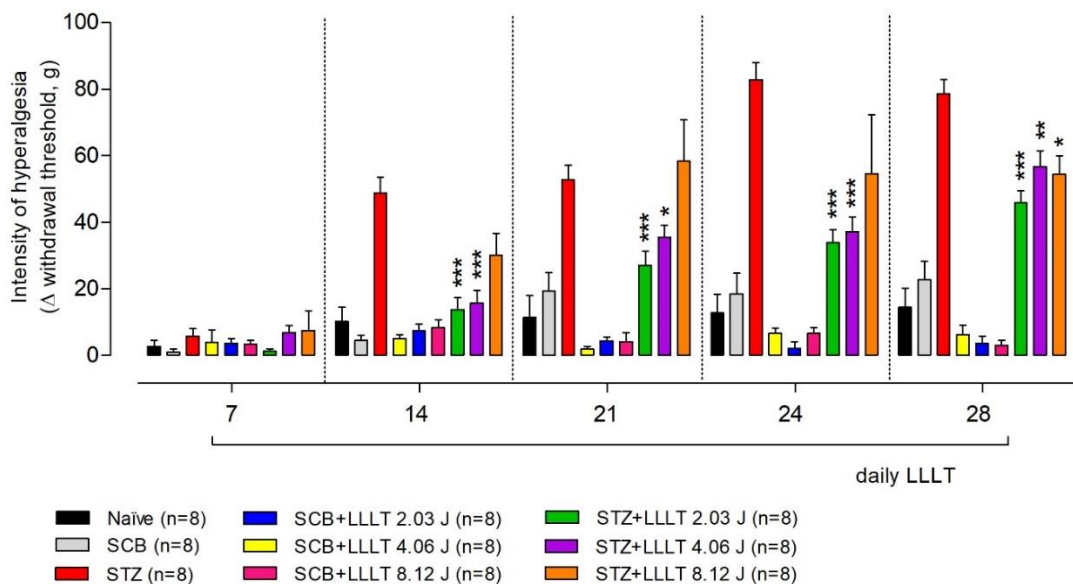


Figura 10. Efeitos das diferentes doses de energia da LLLT (2,03 J; 4,06 J; 8,12 J) durante o desenvolvimento da dor neuropática diabética, com base na hiperalgesia mecânica pelo teste de Randall-Selitto. Os animais diabéticos sem tratamento (grupo STZ; **barras vermelhas**) apresentaram aumento da significativo da intensidade de hiperalgesia mecânica a partir do 14º dia após o início das injeções de STZ, em comparação aos grupos controle ($p < 0,001$). Este aumento da intensidade de hiperalgesia no grupo STZ tornou-se ainda mais intenso no 21º e no 28º dia, em comparação aos grupos que receberam injeção de veículo ($p < 0,001$). A LLLT nas doses de 2,03 J e 4,06 J [grupos STZ+LLLT 2.03 J (**barras verdes**) e STZ+LLLT 4.06 J

(barras violetas)], foi capaz de manter os níveis de hiperalgesia em valores inferiores aos observados em animais neuropáticos sem tratamento (grupo STZ), nos períodos de 14 ($p < 0,001$), 21 ($p < 0,001$ e $p < 0,05$), 24 ($p < 0,001$) e 28 ($p < 0,001$ e $p < 0,01$) dias. Para a dose de 8,12 J (grupo STZ+LLLT 8.12 J; barras laranjas), só foram observadas diferenças com relação ao grupo STZ no 28º dia ($p < 0,05$). Animais dos grupos controle submetidos à LLLT [grupos SCB+LLLT 2.03 J (barras azuis), SCB+LLLT 4.06 J (barras amarelas) e SCB+LLLT 8.12 J (barras cor-de-rosa)], não apresentaram alterações do limiar mecânico. ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolos (*), (**) e (***) na posição vertical, representam $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$, respectivamente. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.3.1 Escolha da dose de energia total de trabalho: 2,03 J

Nos testes comportamentais para hiperalgesia mecânica demonstrados anteriormente, que se referem aos efeitos da LLLT durante o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica, observamos que a dose total de energia de 2,03 J (grupo STZ+LLLT 2.03 J), foi mais eficaz na prevenção da hiperalgesia mecânica, em comparação às demais doses testadas (4,06 J e 8,12 J; grupos STZ+LLLT 4.06 J e STZ+LLLT 8.12 J, respectivamente). O grupo STZ+LLLT 2.03 J apresentou redução significativa da intensidade de hiperalgesia mecânica em comparação ao grupo STZ (sem tratamento), nos períodos de 14 ($p < 0,001$), 21 ($p < 0,001$), 24 ($p < 0,001$) e 28 ($p < 0,001$) dias após o início das injeções de STZ (ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni). Nos gráficos da Figura 11, é possível observar, com maior detalhe, os efeitos de cada dose total de energia testada (grupos STZ+LLLT 2.03 J, Painel A; STZ+LLLT 4.06 J, Painel B; STZ+LLLT 8.12 J, Painel C), comparando-as aos grupos STZ e controles.

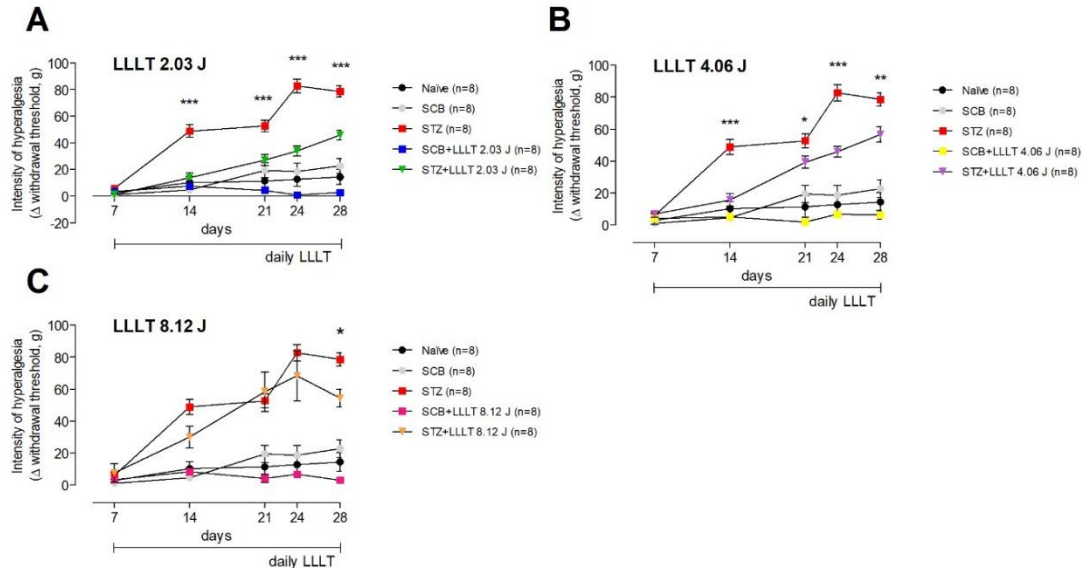


Figura 11. Escolha da dose total de energia de trabalho (em Joule), com base na maior eficiência em prevenir o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica em ratos diabéticos. **Painel A:** gráfico de linhas demonstrando a intensidade de hiperalgesia mecânica (Δ withdrawal threshold, g) no decorrer das semanas do protocolo experimental, com aplicação de LLLT na dose total de 2,03 J. A partir do 14º dia após o início das injeções de STZ, os animais do grupo STZ+LLLT 2.03 J (triângulos verdes) apresentaram intensidade de hiperalgesia mecânica significativamente ($p < 0,001$) inferior aos animais do grupo STZ (quadrados vermelhos). Este comportamento também foi observado nos períodos de 21 ($p < 0,001$), 24 ($p < 0,001$) e 28 ($p < 0,001$) dias. **Painel B:** gráfico de linhas demonstrando a intensidade de hiperalgesia mecânica (Δ withdrawal threshold, g) no decorrer das semanas do protocolo experimental, com aplicação de LLLT na dose total de 4,06 J. Houve redução significativa da intensidade de hiperalgesia mecânica no grupo STZ+LLLT 4.06 J (triângulos violetas) em comparação ao grupo STZ, nos períodos de 14 ($p < 0,001$), 21 ($p < 0,05$), 24 ($p < 0,001$) e 28 ($p < 0,01$) dias após o início das injeções de STZ. **Painel C:** gráfico de linhas demonstrando a intensidade de hiperalgesia mecânica (Δ withdrawal threshold, g) no decorrer das semanas do protocolo experimental, com aplicação de LLLT na dose total de 8,12 J. Foi observada redução significativa ($p < 0,05$) da intensidade de hiperalgesia mecânica no grupo STZ+LLLT 8.12 J (triângulos laranjas) em comparação ao grupo STZ, apenas no 28º dia do protocolo experimental. ANOVA two-way seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolos (*), (**) e (***) representam $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$, respectivamente. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

Com base nesses resultados e, também, a partir das orientações da WALT (*World Association for Laser Therapy*), que recomenda o uso de menores densidades de energia para promover os efeitos biológicos desejados, decidimos estabelecer a dose total de energia de

2,03 J como *dose de trabalho*, a ser aplicada para os demais testes previstos no presente estudo.

5.4 Efeito anti-hiperalgésico da LLLT após o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica induzida por STZ

No estudo dos efeitos da LLLT sobre o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica, observamos que alguns animais diabéticos, cerca de 20 % dos que recebem as injeções de STZ, não desenvolvem hiperalgesia mecânica no decorrer das semanas que se seguem ao protocolo de indução do diabetes. Por isso, decidimos estudar o efeito da LLLT apenas em ratos diabéticos hiperalgésicos, os quais foram selecionados no 19º dia do protocolo experimental, ou seja, dois dias antes do primeiro pico de hiperalgesia mecânica, já conhecido no modelo de estudo (ATHIE *et al.*, 2018; TEIXEIRA *et al.*, 2019). Dessa maneira, no 19º dia do protocolo experimental, foi realizado o teste de von Frey eletrônico para seleção de ratos diabéticos que apresentassem hiperalgesia mecânica. O teste foi realizado por avaliador cego aos diferentes grupos experimentais. Assim sendo, a LLLT foi aplicada diariamente entre o 21º e o 28º dia do protocolo experimental, somente em ratos diabéticos hiperalgésicos, conforme ilustrado no esquema representativo da Figura 12.

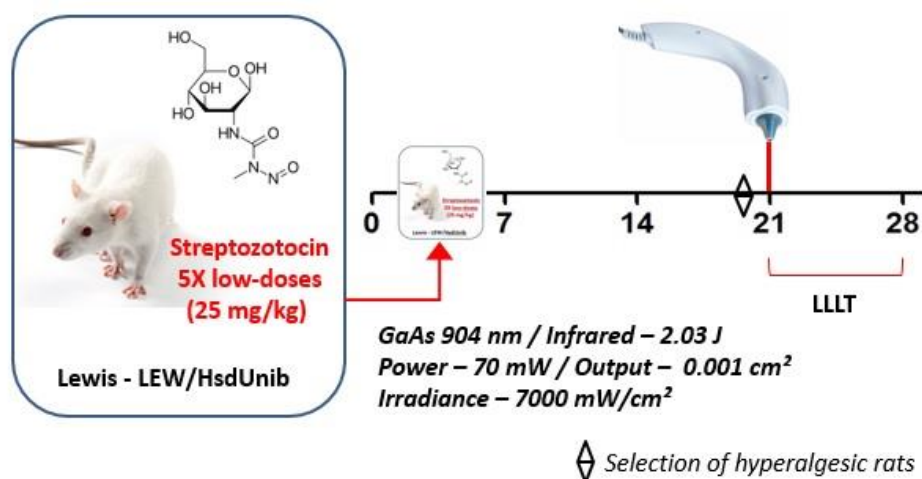


Figura 12. Esquema representativo do protocolo experimental utilizado para estudo dos efeitos anti-hiperalgésicos da LLLT após o desenvolvimento da neuropatia diabética. Ratos Lewis isogênicos, machos, 4-8 semanas de idade, 200-250 g, receberam 5 injeções intraperitoneais de STZ (25 mg/kg) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) ou veículo (tampão citrato de sódio 0,1 M), 1 injeção por dia, durante 5 dias consecutivos. No 19º dia após o início das injeções de STZ ou veículo, foi realizada a seleção dos ratos hiperalgésicos. Entre os dias 21 e 28, foi realizado o tratamento com LLLT nos grupos STZ+LLLT e SCB+LLLT. A LLLT seguiu os parâmetros descritos no item 4.5.1, utilizando a energia total de 2,03 J, durante 29 s. As análises comportamentais e as medidas de glicemia plasmática e massa corpórea, foram realizadas nos dias 0, 7, 14, 21, 24 e 28. No 28º dia após o início das injeções de STZ ou veículo, os animais foram eutanasiados e os GRDs L4-L5 foram coletados e armazenados para posterior processamento e análises.

No 21º dia, após uma única sessão de LLLT, não houve redução da hiperalgesia mecânica nos animais submetidos ao tratamento, entretanto, no 24º e 28º dia do protocolo experimental, a LLLT foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,001$; ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) a intensidade de hiperalgesia mecânica nos ratos do grupo STZ+LLLT, em comparação aos ratos do grupo STZ (sem tratamento), conforme observado na Figura 13. Animais do grupo SCB+LLLT, que receberam injeções do veículo da STZ (tampão citrato de sódio; 0,1 M) e foram expostos à LLLT, não apresentaram alterações no limiar mecânico e mantiveram valores similares aos observados nos grupos SCB e Naïve.

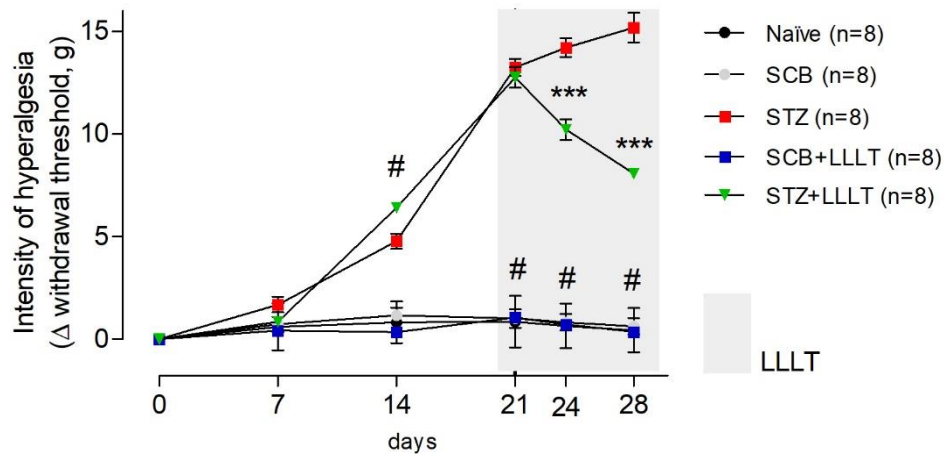


Figura 13. Efeito anti-hiperalgésico da LLLT após o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica induzida por STZ. Os valores referem-se à média da intensidade de hiperalgesia (Δ withdrawal threshold, g) entre as patas direita e esquerda traseiras. Os animais dos grupos STZ (**quadrados vermelhos**) e STZ+LLLT (**triângulos verdes**) apresentaram aumento significativo da intensidade de hiperalgesia a partir do 14º dia do protocolo experimental. No 21º dia, uma única sessão de LLLT não foi capaz de promover efeito anti-hiperalgésico. No 24º e 28º dia, foram observadas diferenças significativas na intensidade de hiperalgesia mecânica entre os grupos STZ e STZ+LLLT ($p < 0,001$), e entre estes comparados aos controles [Naïve (**símbolos pretos**); SCB (**círculos cinzas**); SCB+LLLT (**quadrados azuis**)] ($p < 0,001$). ANOVA two-way seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolos (#) e (***) representam $p < 0,001$, na comparação entre STZ e STZ+LLLT versus Naïve, SCB e SCB+LLLT, e na comparação entre STZ versus STZ+LLLT, respectivamente; área cinza ao fundo, delimita o período de aplicação da LLLT, entre o 21º e o 28º dia do protocolo experimental. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.5 Efeitos da LLLT sobre a hiperglicemia e a massa corpórea dos animais após o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica induzida por STZ

5.5.1 Hiperglicemia

O tratamento com LLLT não influenciou nos níveis glicêmicos dos animais após a instalação da neuropatia diabética periférica. Os animais diabéticos neuropáticos, submetidos ou não à LLLT (grupos STZ+LLLT e STZ, respectivamente), apresentaram valores similares de hiperglicemia, sendo estes estatisticamente diferentes dos animais que receberam injeção de veículo e foram submetidos ou não à LLLT (grupos SCB+LLLT e SCB, respectivamente), no 21º ($p < 0,001$), 24º ($p < 0,001$), e 28º ($p < 0,001$) dia do protocolo experimental (ANOVA

two-way seguido por pós-teste de Bonferroni), conforme observado na Figura 14. Animais dos grupos SCB e SCB+LLLT apresentaram valores de glicemia plasmática em níveis similares aos do grupo Naïve.

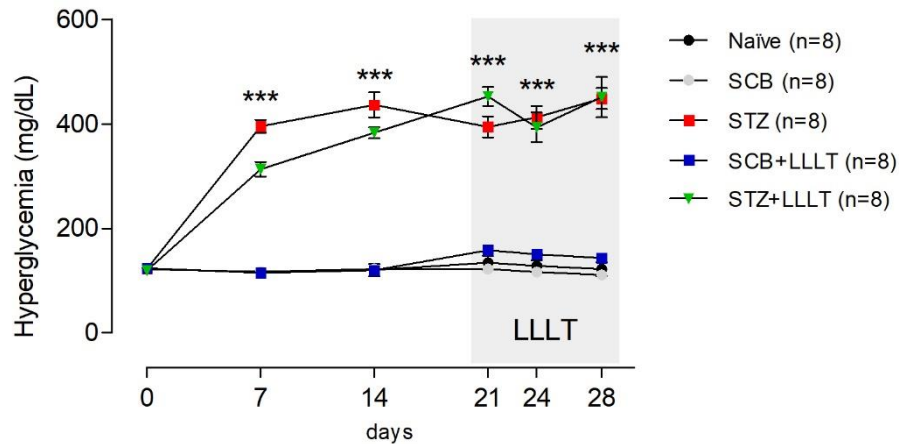


Figura 14. Efeito da LLLT sobre a hiperglicemia induzida por múltiplas doses de STZ após o desenvolvimento da neuropatia diabética. A área cinza ao fundo indica o período de aplicação da LLLT, entre os dias 21 e 28 do protocolo experimental, a qual não influenciou os níveis glicêmicos dos animais diabéticos neuropáticos (grupo STZ+LLLT; **triângulos verdes**), que mantiveram os mesmos níveis de hiperglicemia dos animais diabéticos neuropáticos sem tratamento (grupo STZ; **quadrados vermelhos**). Houve diferença significativa ($p < 0,001$) apenas dos grupos STZ e STZ+LLLT em relação aos que receberam injeção do veículo (tampão citrato de sódio; 0,1 M) e foram submetidos ou não à LLLT [SCB+LLLT (**quadrados azuis**) e SCB (**círculos cinzas**), respectivamente]. ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolo (***) representa $p < 0,001$. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.5.2 Massa corpórea

Assim como para os níveis de glicemia, a LLLT não apresentou efeitos sobre a massa corpórea dos animais, quando aplicada entre os dias 21 e 28 do protocolo experimental, após a instalação da neuropatia diabética periférica. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,001$; ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) entre os animais diabéticos neuropáticos submetidos ou não à LLLT (grupos STZ+LLLT e STZ, respectivamente) com relação ao grupo Naïve e aos que receberam injeção do veículo (tampão citrato de sódio, 0,1 M) e foram submetidos ou não à LLLT (grupos SCB+LLLT e SCB, respectivamente), entre os dias 21 e 28. Animais dos grupos STZ e STZ+LLLT sofreram interrupção no ganho de

peso, que foi observada a partir do 7º dia após o início das injeções de STZ, conforme pode ser observado na Figura 15.

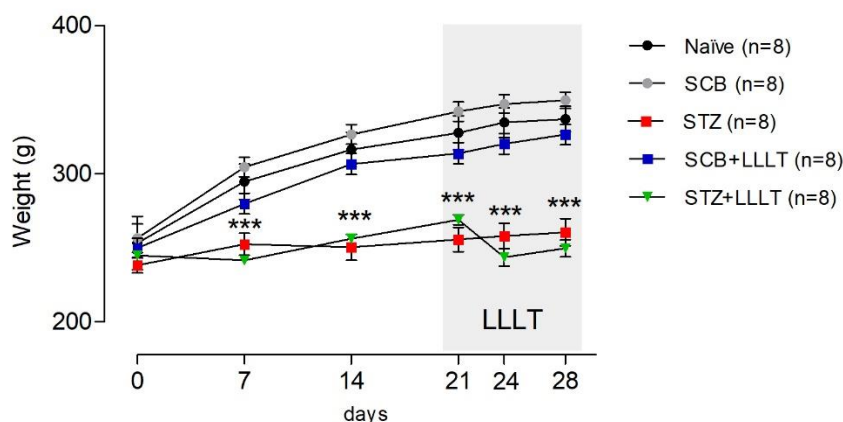


Figura 15. Efeito da LLLT sobre a massa corpórea dos animais após o desenvolvimento da neuropatia diabética. A área cinza ao fundo indica o período de aplicação da LLLT, entre os dias 21 e 28 do protocolo experimental, a qual não demonstrou influência sobre a massa corpórea dos animais diabéticos neuropáticos (grupo STZ+LLLT; **triângulos verdes**), que mantiveram os mesmos valores dos animais diabéticos neuropáticos sem tratamento (grupo STZ; **quadrados vermelhos**). Houve diferença significativa ($p < 0,001$) apenas dos grupos STZ e STZ+LLLT em relação aos que receberam injeção do veículo (tampão citrato de sódio; 0,1 M) e foram submetidos ou não à LLLT [SCB+LLLT (**quadrados azuis**) e SCB (**círculos cinzas**), respectivamente]. Os animais destes grupos (SCB e SCB+LLLT) e do grupo Naïve (**círculos pretos**), ganharam peso normalmente no decorrer das semanas. ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolo (***) representa $p < 0,001$. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.6 Caracterização das alterações da função motora dinâmica e correlações com hiperalgesia mecânica em ratos diabéticos neuropáticos

Conforme descrito no item 3.2, um dos objetivos específicos do estudo foi identificar alterações no padrão de marcha de ratos diabéticos neuropáticos e buscar possíveis correlações entre função motora dinâmica e hiperalgesia mecânica. Primeiramente, foi realizada a caracterização da marcha dos ratos diabéticos neuropáticos (grupo STZ) e ratos-controle (grupo SCB), por meio do sistema CatWalk XT (Noldus Information Technology®, Wageningen, Holanda), e identificadas alterações em parâmetros espaço-temporais e de intensidade das pegadas. Algumas dessas alterações demonstraram forte correlação com a hiperalgesia mecânica observada nos ratos diabéticos neuropáticos. Posteriormente à caracterização da marcha, o objetivo foi verificar se a LLLT teria efeito positivo sobre os parâmetros alterados (aqueles com forte correlação com hiperalgesia mecânica), no sentido de restabelecer a funcionalidade para níveis mais próximos do grupo controle (SCB).

A análise de função motora dinâmica foi realizada nos períodos 0, 7, 14, 21 e 28 dias após o início das injeções de STZ ou veículo. Cada animal realizou três corridas válidas por período, sendo 24 corridas por período para o grupo STZ e 21 corridas por período para o grupo SCB. Ao final do protocolo experimental, o grupo STZ realizou 120 corridas o grupo SCB realizou 105 corridas. Em paralelo, os animais foram submetidos ao teste de von Frey eletrônico com intuito de monitorar o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica [Δ do limiar, intensidade de hiperalgesia (g)]. Os resultados da caracterização da marcha no modelo de neuropatia diabética experimental estão descritos em detalhes nos itens a seguir.⁶

⁶ O artigo científico referente à correlação entre função motora dinâmica e hiperalgesia mecânica, no modelo de neuropatia diabética experimental, “*Gait analysis correlates mechanical hyperalgesia in a model of streptozotocin-induced diabetic neuropathy: a CatWalk dynamic motor function study*”, está disponível na seção de APÊNDICES (Apêndice 7).

5.6.1 Parâmetros Gerais das corridas

Parâmetros gerais, relacionados à média das corridas realizadas por cada animal, como Duração da corrida (*Run duration*) (s), Velocidade média da corrida (*Run average speed*; RAS) (cm/s), Variação máxima da corrida (*Run maximum variation*) (%), Número de passos (*Number of steps*) e Cadência da marcha (*Cadence*) (passos/segundo), não demonstraram diferenças entre os grupos STZ e SCB, conforme observado nos gráficos da Figura 16. Tais parâmetros consideram o animal como um todo, e não diferenciam as patas direitas (RF, *right frontlimb*; RH, *right hindlimb*) e esquerdas (LF, *left frontlimb*; LH, *left hindlimb*).

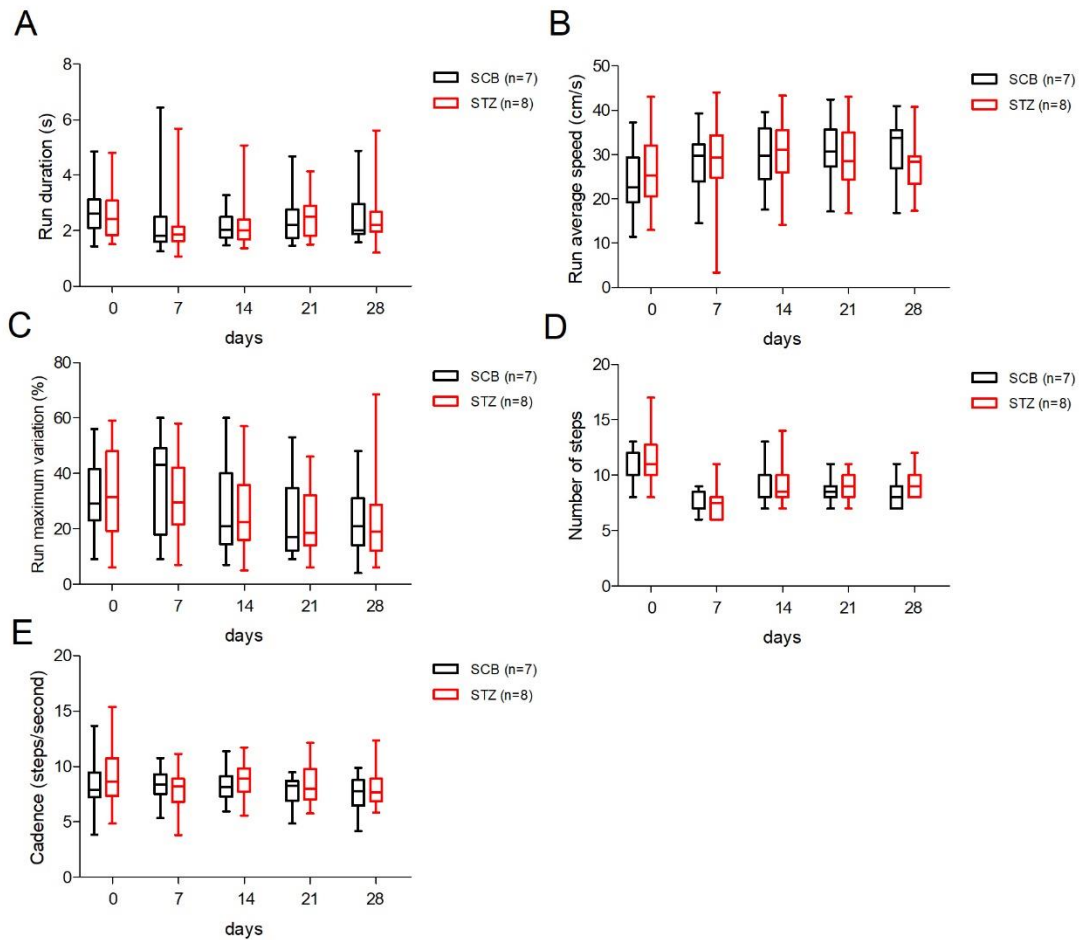


Figura 16. Parâmetros gerais das corridas. Os parâmetros gerais, relacionados às corridas realizadas por cada animal, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos STZ (*box and whiskers vermelhos*) e SCB (*box and whiskers pretos*) em todos os períodos analisados. Entende-se por parâmetros gerais: Duração da corrida (*Run duration*, em segundos; **Painel A**); Velocidade média da corrida (*Run average speed*, cm/s; **Painel**

B); Variação máxima da corrida (*Run maximum variation*, %; **Painel C**); Número de passos (*Number of steps*; **Painel D**); Cadência da marcha (*Cadence*, passos/segundo; **Painel E**). ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.6.2 Parâmetros de intensidade relacionados às patas traseiras (*hindlimbs*)

Os parâmetros de intensidade são gerados a partir da intensidade do brilho dos pixels na imagem formada durante o contato das patas com a passarela de vidro. No 14º dia do protocolo experimental, os animais do grupo STZ apresentaram redução significativa na intensidade do contato das patas, o que pode ser observado na imagem 2D (*2D footprint intensities*) (Figura 17, Painéis A e B), e nos gráficos representativos da intensidade média relacionados à impressão das pegadas, em 2D (Figura 17, Painéis C e D) e 3D (Figura 18).

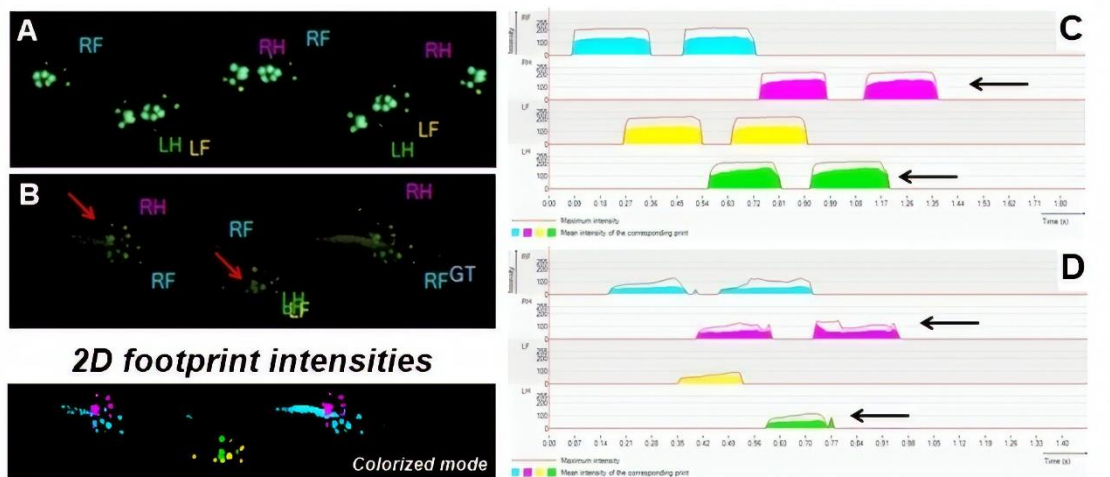


Figura 17. Imagem 2D capturada através da passarela de vidro do sistema CatWalk (*2D footprint intensities*) e gráficos representativos da intensidade. **Painel A:** Padrão de marcha de animais do grupo SCB, demonstrando impressões normais das pegadas no 14º dia após o início das injeções do veículo (tampão citrato de sódio; 0,1 M); as áreas dos dígitos e da almofada plantar (glabra) aparecem bem delimitados no grupo controle (SCB). **Painel B:** ratos do grupo STZ apresentaram redução na área de contato da pata, com pouca resolução na impressão das pegadas conforme apontado pelas setas vermelhas. A baixa definição nas impressões das pegadas traseiras (RH e LH) representam um padrão de marcha alterado. **Painel C:** gráfico representativo da intensidade aplicada pelos animais do grupo SCB, 14 dias após o início das injeções do veículo (tampão citrato de sódio; 0,1 M). Setas na cor preta estão apontando para RH (*right hindlimb*, pata direita traseira) (rosa) e LH (*left hindlimb*, pata esquerda traseira) (verde), ambas em uma condição normal de intensidade de contato da pata, em unidades arbitrárias. **Painel D:** gráfico representativo da intensidade aplicada

pelos animais do grupo STZ, 14 dias após o início das múltiplas injeções de STZ (25 mg/kg). **Setas na cor preta** indicam a redução das intensidades máxima (**linha vermelha**) e média (áreas coloridas, **rosa** e **verde**), para ambas as patas correspondentes (RH e LH; *right hindlimb* e *left hindlimb*, respectivamente). RF: pata direita da frente; LF: pata esquerda da frente; RH: pata direita traseira; LH: pata esquerda traseira; GT: genitália.

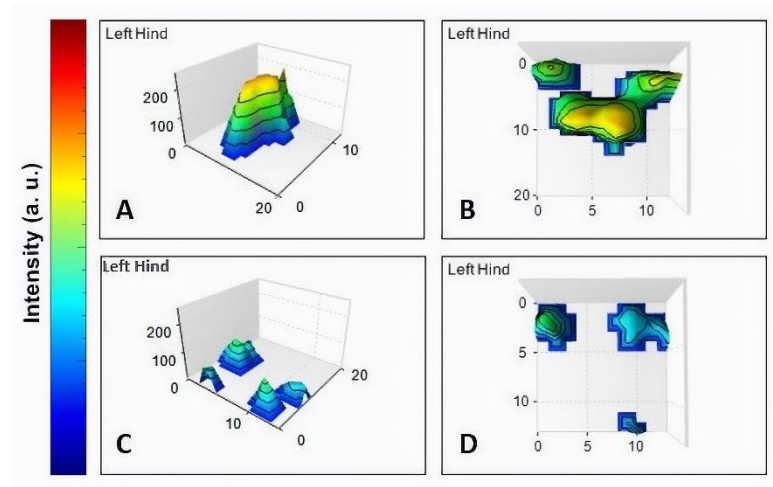


Figura 18. Esquema 3D, representativo da intensidade das impressões das pegadas. Painéis A e B: vista 3D, lateral e superior, respectivamente, de uma pata posterior esquerda (*left hindlimb*) de rato pertencente ao grupo SCB, no 14º dia após o início das injeções do veículo (tampão citrato de sódio; 0,1 M). É possível observar o contato e a intensidade normais da impressão da pegada, representado pelas cores graduais na barra de intensidade à esquerda (**azul**: menor intensidade; **vermelho**: maior intensidade). **Painéis C e D:** vista 3D, lateral e superior, respectivamente, de uma pata posterior esquerda (*left hindlimb*) de rato pertencente ao grupo STZ, no 14º dia após o início das injeções de STZ (25 mg/kg). Há importante redução na intensidade e alterações no posicionamento da pata. a. u. = unidades arbitrárias.

Estatisticamente, foi observada redução significativa nos parâmetros de Intensidade Máxima (*Maximum Intensity*) ($p < 0,01$; ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni), Intensidade Média (*Mean Intensity*) ($p < 0,05$; ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) e Intensidade Média dos 15 pixels mais intensos (*Mean Intensity of the 15 Most Intense Pixels*) ($p < 0,001$; ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) dos animais do grupo STZ em comparação aos animais que receberam injeção do veículo (tampão citrato de sódio; 0,1 M) (grupo SCB), conforme demonstrado nos gráficos da Figura 19.

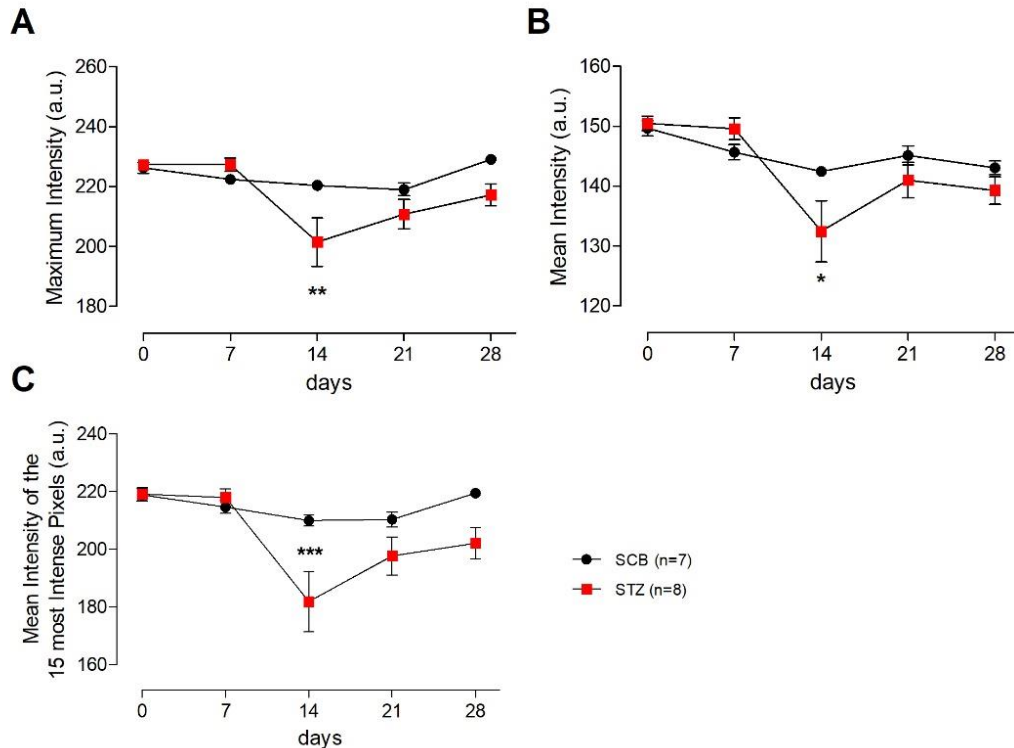


Figura 19. Parâmetros de intensidade relacionados às patas traseiras mostram-se alterados na neuropatia diabética periférica induzida por STZ. Painei A: No 14º dia do protocolo experimental, houve redução significativa ($p < 0,01$) da Intensidade Máxima (*Maximum Intensity*, a. u.) no contato das patas traseiras dos animais do grupo STZ (**quadrados vermelhos**) em comparação aos animais do grupo SCB (**círculos pretos**). **Painei B:** o parâmetro de Intensidade Média (*Mean Intensity*; a u.) também apresentou redução significativa ($p < 0,05$) no grupo STZ em comparação ao SCB, no 14º dia do protocolo experimental. **Painei C:** gráfico apresentando redução significativa ($p < 0,001$) da Intensidade Média dos 15 pixels mais intensos (*Mean Intensity of the 15 Most Intense Pixels*; a. u.) no grupo STZ em comparação ao grupo SCB, no 14º dia do protocolo experimental. ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolos (*), (**) e (***) representam $p < 0,05$, $p < 0,01$, e $p < 0,001$, respectivamente; a. u. = unidades arbitrárias. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.6.3 Parâmetros espaço-temporais relacionados às patas traseiras (*hindlimbs*)

Os dois principais parâmetros espaço-temporais da marcha, Apoio (s) e Balanço (s) (*Stand* e *Swing*, respectivamente), não apresentaram alterações na comparação entre os grupos STZ e SCB, durante todo o período de análise (Figura 20). Por meio dos diagramas representativos de tempo de Apoio e Balanço, também é possível observar o contato normal para cada pata durante a marcha, como observado na Figura 21.

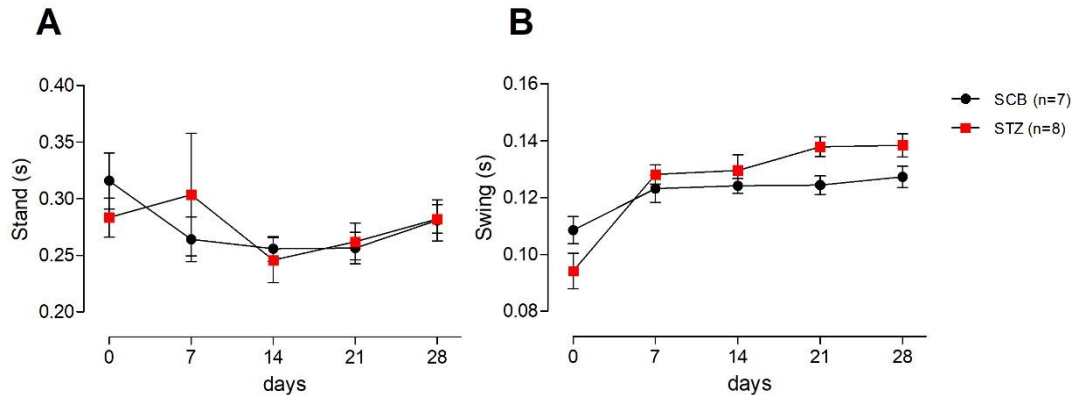


Figura 20. Parâmetros espaço-temporais: Apoio (*Stand*) e Balanço (*Swing*). **Painel A:** gráfico apresentando a fase de Apoio (*Stand* ou *Stance*) da marcha, que se refere ao tempo médio (s) em que cada animal permanece com as patas traseiras em contato com a passarela, avaliado a cada semana do protocolo experimental. Não há diferenças entre os grupos STZ (**quadrados vermelhos**) e SCB (**círculos pretos**). **Painel B:** gráfico apresentando a fase de Balanço (*Swing*) da marcha, que representa o tempo médio (s) em que os animais se mantiveram com as patas posteriores em elevação, ou seja, o tempo entre dois apoios consecutivos de cada pata. ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

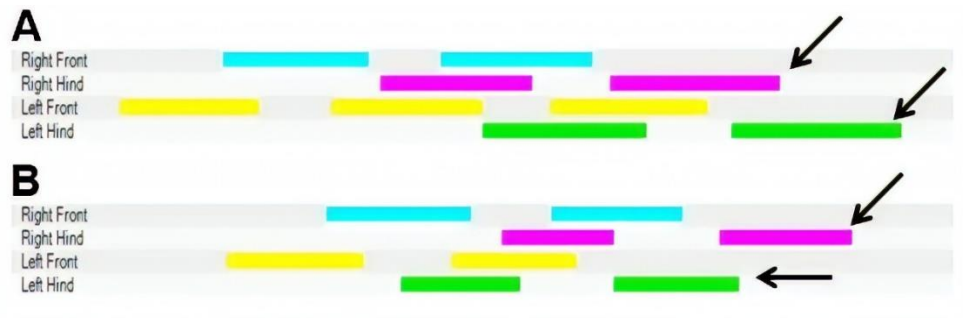


Figura 21. Diagramas de tempo ilustrando o contato das patas. **Painéis A e B:** Ilustrações representativas do tempo de apoio das patas (s), registrado durante a marcha no período de 28 dias após o início das injeções de STZ (25 mg/kg) (grupo STZ) e tampão citrato de sódio (0,1 M) (grupo SCB), respectivamente. O comprimento de cada barra representa a duração do Apoio (s) para uma pata específica. Os espaços vazios entre as barras indicam o Balanço (s) (momento em que a pata está em elevação). As **setas pretas** estão indicando as patas direita (*right hindlimb*; **barras cor-de-rosa**) e esquerda (*left hindlimb*; **barras verdes**) traseiras em ambos os grupos (STZ e SCB; **A e B**, respectivamente). Nenhuma alteração espaço-temporal foi observada.

5.6.4 Parâmetros espaciais relacionados às patas traseiras (*hindlimbs*)

No 28º dia do protocolo experimental, os animais do grupo STZ apresentaram redução significativa em alguns parâmetros espaciais da marcha, quando comparados aos animais do grupo SCB. Estes parâmetros referem-se à Área Máxima de Contato (*Max Contact Area*) (cm²) ($p < 0,01$; ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni), Comprimento da Passada (*Stride Length*) (cm) ($p < 0,01$; ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni), Largura da Pegada (*Print Width*) (cm) ($p < 0,01$; ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) e Área da Pegada (*Print Area*) (cm²) ($p < 0,01$; ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni), como observado na Figura 22.⁷

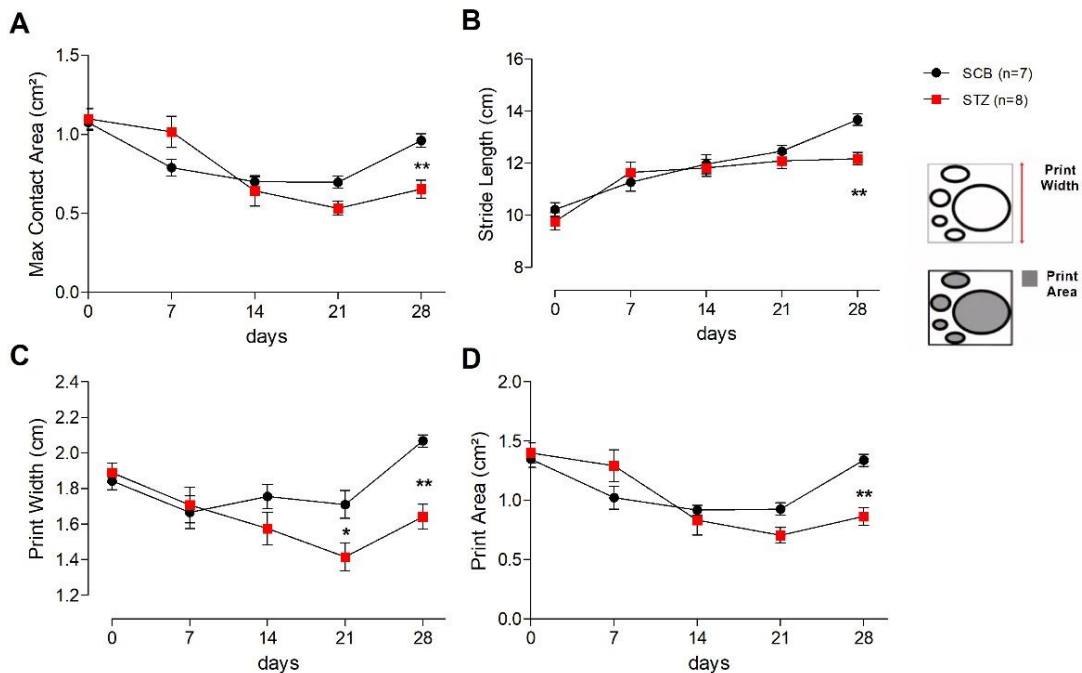


Figura 22. Parâmetros espaciais da marcha. Paineis A: No 28º dia do protocolo experimental houve redução significativa ($p < 0,01$) da Área Máxima de Contato (*Maximum Contact Area*) (cm²) no grupo STZ (**quadrados**

⁷- Área Máxima de Contato (*Max Contact Area*) (cm²): É a área máxima ocupada por uma determinada pata durante o período de tempo em que foi capturada a maior Área de Impressão da Pegada (*Print Area*) (cm²);
- Comprimento da Passada (*Stride Length*) (cm): É a distância, em centímetros, entre dois contatos consecutivos da mesma pata;
- Largura da Pegada (*Print Width*) (cm): É a largura, em centímetros, completa de uma pegada na posição vertical;
- Área da Pegada (*Print Area*) (cm²): É a área de superfície completa de uma pegada, envolvendo a área ocupada pelos dígitos mais a área da almofada plantar.

vermelhos) em comparação ao SCB (**círculos pretos**). **Painel B:** houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre o Comprimento da Passada (*Stride Length*) (cm) do grupo STZ em comparação ao SCB, no 28º dia do protocolo experimental. **Painel C:** no 21º e no 28º dia, houve redução significativa ($p < 0,05$; $p < 0,01$, respectivamente) da Largura da Pegada (*Print Width*) (cm) no grupo STZ em comparação ao SCB. **Painel D:** houve redução significativa ($p < 0,01$) da Área da Pegada (*Print Area*) (cm²) no grupo STZ em comparação ao SCB, no 28º dia do protocolo experimental. Todos os parâmetros referem-se à média entre as duas patas traseiras (RH, direita; LH, esquerda). ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolos (*) e (**) representam $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

Outros parâmetros da marcha analisados pelo sistema CatWalk XT não apresentaram diferenças entre os grupos STZ e SCB. Tais parâmetros correspondem à velocidade corporal [*Body Speed* (cm/s); *Body Speed Variation* (%)], ciclo do passo [*Step Cycle* (s)], apoios único [*Single Stance* (s)] e duplo [*Initial Dual Stance* (s)] e ciclo de trabalho [*Duty Cycle* (%)], conforme demonstrado na Figura 23.

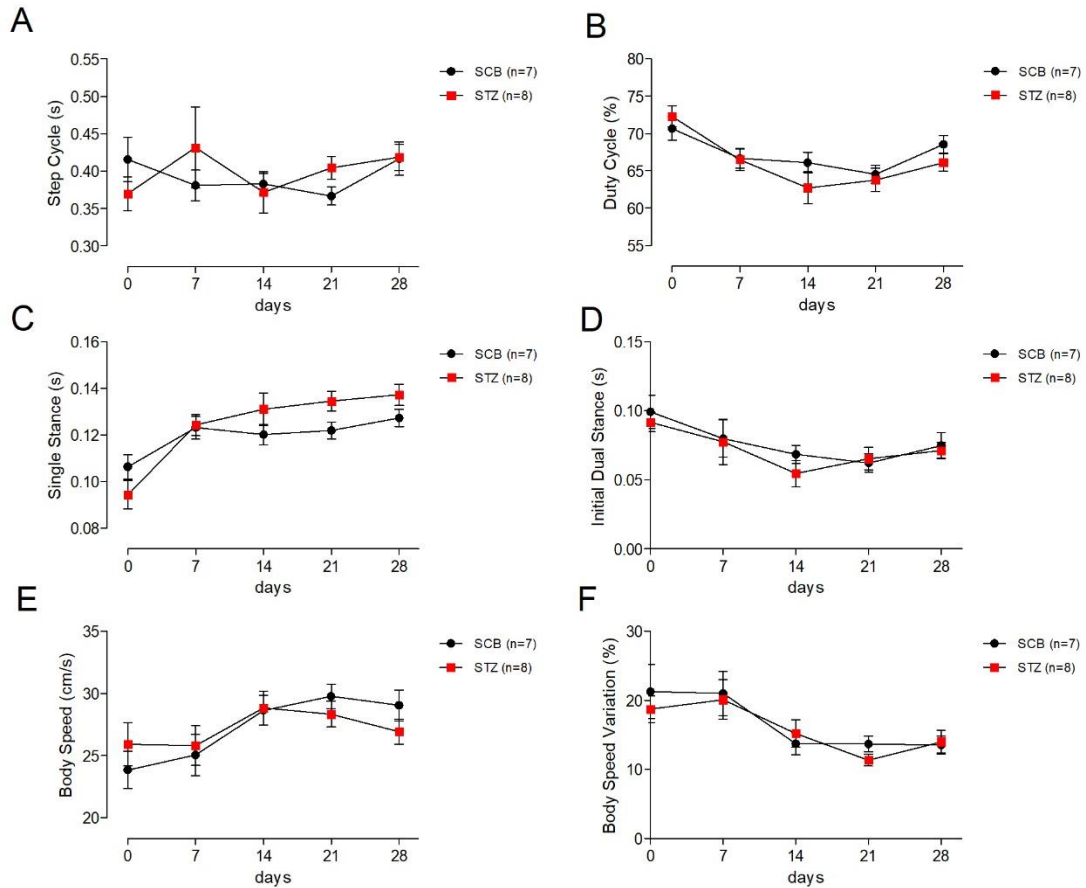


Figura 23. Outros parâmetros da marcha. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos STZ (**quadrados vermelhos**) e SCB (**círculos pretos**) para os parâmetros Ciclo do Passo (*Step Cycle*) (s) (**Painel A**), Ciclo de Trabalho (*Duty Cycle*) (%) (**Painel B**), Apoio Único (*Single Stance*) (s) (**Painel C**), Início do Duplo-Apoio (*Initial Dual Stance*) (s) (**Painel D**), Velocidade Corporal (*Body Speed*) (cm/s) (**Painel E**) e Variação da Velocidade Corporal (*Body Speed Variation*) (%) (**Painel F**). Os valores de todos os parâmetros representam a média obtida entre as patas traseiras (RH, direita; LH, esquerda). ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.6.5 Teste de Correlação de Pearson (PCC) e Regressão Linear (von Frey X CatWalk)

Esta análise foi realizada a fim de observarmos se um aumento na sensibilidade do animal à um estímulo de origem mecânica, por meio do teste de von Frey eletrônico, poderia expressar-se também como alterações em parâmetros da marcha, analisados pelo sistema CatWalk XT. A partir disso, foi realizado teste de Correlação de Pearson e regressão linear, considerando os valores de hiperalgesia mecânica *versus* parâmetros da marcha. Destes,

apenas três apresentaram forte correlação com o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica no decorrer das semanas do protocolo experimental.

De acordo com o Coeficiente de Correlação de Pearson (PCC), os parâmetros Área Máxima de Contato (*Max Contact Area*) (cm²), Comprimento da Passada (*Stride Length*) (cm) e Área da Pegada (*Print Area*) (cm²), apresentaram forte correlação com a hiperalgesia mecânica, ou seja, estes parâmetros, obtidos a partir da análise da marcha pelo sistema CatWalk XT, alteraram-se em paralelo ao desenvolvimento da hiperalgesia mecânica no decorrer das quatro semanas do protocolo experimental. O teste de Correlação de Pearson e as linhas de regressão linear são apresentados nos gráficos da Figura 24.

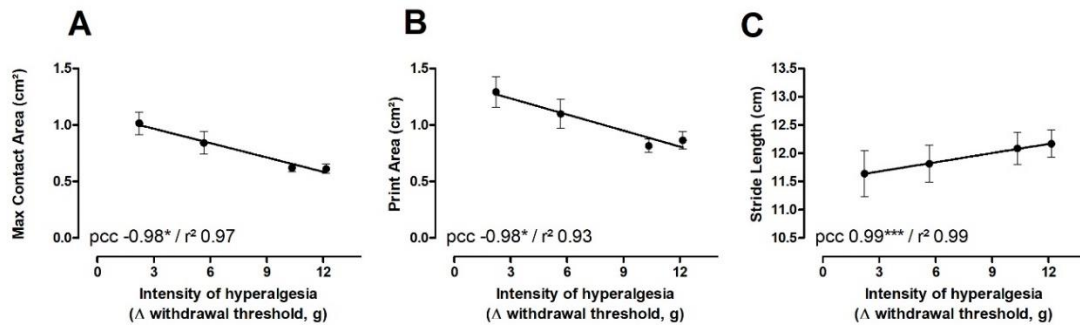


Figura 24. Coeficiente de Correlação de Pearson (PCC): parâmetros de marcha (CatWalk XT) versus intensidade de hiperalgesia mecânica (von Frey eletrônico). À medida em que a Área Máxima de Contato (*Maximum Contact Area*; **Painel A**) (cm²) e a Área da Pegada (*Print Area*; **Painel B**) (cm²) diminuem, a média da intensidade de hiperalgesia mecânica (Δ do limiar, g) aumenta com o tempo [7 (3 g), 14 (6 g), 21 (9 g) e 28 (12 g) dias após o início das injeções de STZ], como demonstrado pelo Coeficiente de Correlação de Pearson (pcc -0,98; p < 0,05; r² 0,97 e pcc -0,98; p < 0,05; r² 0,93, respectivamente). **Painel C:** À medida em que o Comprimento da Passada (*Stride Length*) (cm) aumenta, a média da intensidade de hiperalgesia mecânica (Δ do limiar, g) também aumenta com o tempo [7 (3 g), 14 (6 g), 21 (9 g) e 28 (12 g) dias após o início das injeções de STZ], como demonstrado pelo Coeficiente de Correlação de Pearson (pcc 0,99; p < 0,001; r² 0,99). Símbolos (*) e (***) representam p < 0,05 e p < 0,001, respectivamente. Dados expressos como média ± erro padrão da média (SEM).

5.7 Efeitos da LLLT sobre as alterações observadas na função motora dinâmica dos ratos diabéticos neuropáticos

Com base nos resultados obtidos na análise de função motora dinâmica dos animais diabéticos neuropáticos (item 5.6) e na correlação das alterações da marcha com o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica (item 5.6.5), verificamos os efeitos da LLLT sobre a Área Máxima de Contato (*Max Contact Area*) (cm²), Área da Pegada (*Print Area*) (cm²) e Comprimento da Passada (*Stride Length*) (cm). A LLLT, aplicada entre o 21º e o 28º dia do protocolo experimental, influenciou positivamente os parâmetros analisados (Figuras 26 e 27), exceto o Comprimento da Passada (*Stride Length*) (cm) (Figura 28). Primeiramente, foi observado pelo padrão geral das impressões das pegadas (mostradas em imagem 2D), que as áreas dos dígitos e da almofada plantar (glabra) aparecem bem delimitados na impressão da pata traseira direita (RH) dos animais do grupo STZ+LLLTT, o que se aproxima do observado nos grupos Naïve e SCB, e difere do grupo STZ, que apresenta redução na área de contato com pouca resolução na impressão da pegada, no 28º dia do protocolo experimental, conforme demonstra a Figura 25.

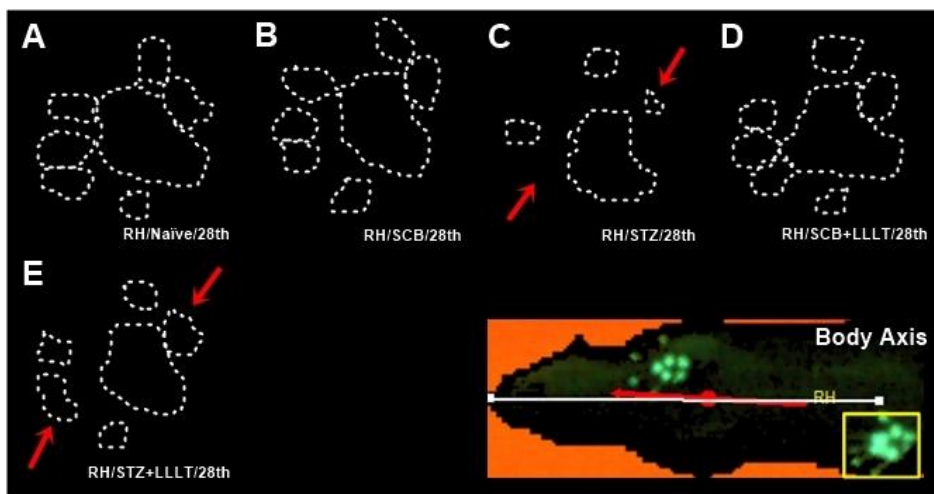


Figura 25. Padrão geral da impressão da pata traseira: imagem 2D capturada através da passarela de vidro do sistema CatWalk XT. As áreas dos dígitos e da almofada plantar (glabra) aparecem bem delimitados na impressão da pata traseira direita (*right hindlimb*; RH) de animais dos grupos Naïve (**Painel A**) e SCB (**Painel B**), no 28º dia do protocolo experimental. Diferentemente, no mesmo período (28º dia), a impressão da

pata de um rato diabético neuropático sem tratamento (grupo STZ), apresenta redução na área de contato, delimitada pela linha branca pontilhada, com pouca resolução na impressão da pegada, conforme apontado pelas **setas vermelhas (Painel C)**. A baixa definição na impressão da pata traseira (*right hindlimb*; RH), representa um padrão de marcha alterado. As impressões das patas observadas nos **Painéis D e E**, referem-se a animais dos grupos SCB+LLLT e STZ+LLLT, respectivamente. No **Painel E** (grupo STZ+LLLT), é possível observar a área de contato mais próxima do controle. No quadro inferior, à direita, o *Body Axis* serve como referência para observar o posicionamento da pata (*right hindlimb*; RH; delimitada pelo **quadro amarelo**), utilizada para análise.

Estatisticamente, foi observada diferença significativa entre os animais diabéticos neuropáticos tratados com LLLT (grupo STZ+LLLT) em relação aos neuropáticos sem tratamento (grupo STZ) no 28º dia do protocolo experimental, para a Área Máxima de Contato (*Max Contact Area*) (cm²) ($p < 0,01$; ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) e Área da Pegada (*Print Area*) (cm²) ($p < 0,05$; ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni).

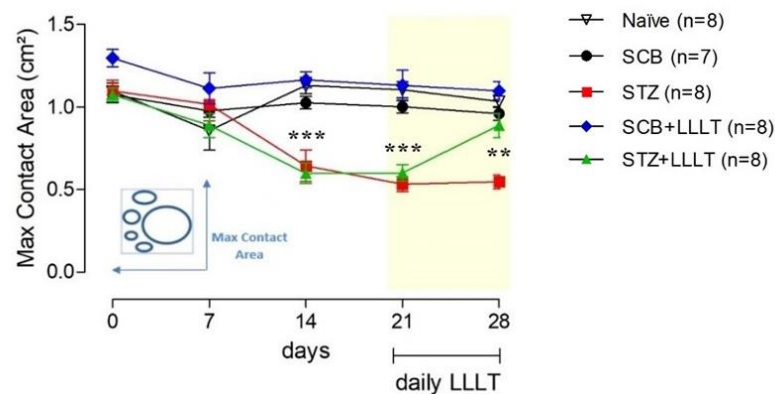


Figura 26. Efeito da LLLT sobre a Área Máxima de Contato (*Maximum Contact Area*) (cm²). A partir do tratamento com LLLT, houve aumento da Área Máxima de Contato (*Max. Contact Area*) (cm²) no 28º dia do protocolo experimental. Uma única sessão de LLLT (21º dia) não foi capaz de alterar a Área Máxima de Contato (cm²), entretanto, este parâmetro retornou a valores próximos dos grupos controle (Naïve e SCB) no 28º dia, no grupo STZ+LLLT (**triângulos verdes**), após oito sessões da terapia, tornando-se significativamente diferente ($p < 0,01$) do grupo STZ (**quadrados vermelhos**), no mesmo período. ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolos (**) e (***) representam $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

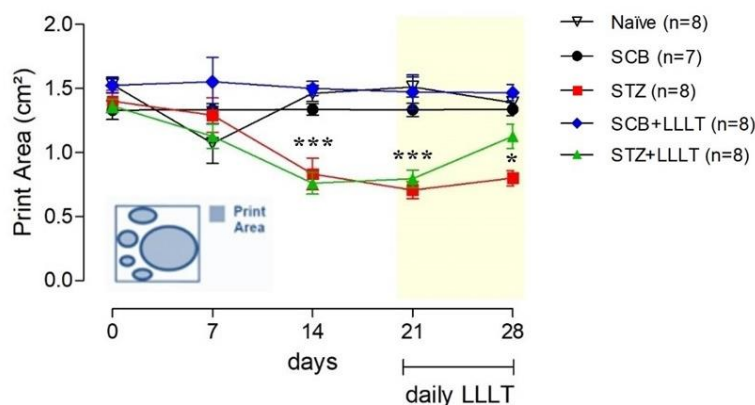


Figura 27. Efeito da LLLT sobre a Área da Pegada (*Print Area*) (cm²). A partir do tratamento com LLLT, houve aumento na Área da Pegada (*Print Area*) (cm²) no 28º dia do protocolo experimental. Assim como observado para a Área Máxima de Contato (cm²), uma única sessão de LLLT (21º dia) não foi capaz de alterar a Área da Pegada (cm²), entretanto, este parâmetro retornou a valores próximos dos grupos controle (Naïve e SCB) no 28º dia, no grupo STZ+LLLT (**triângulos verdes**), após oito sessões da terapia, tornando-se significativamente diferente ($p < 0,05$) do grupo STZ (**quadrados vermelhos**), no mesmo período. ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolos (*) e (***) representam $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

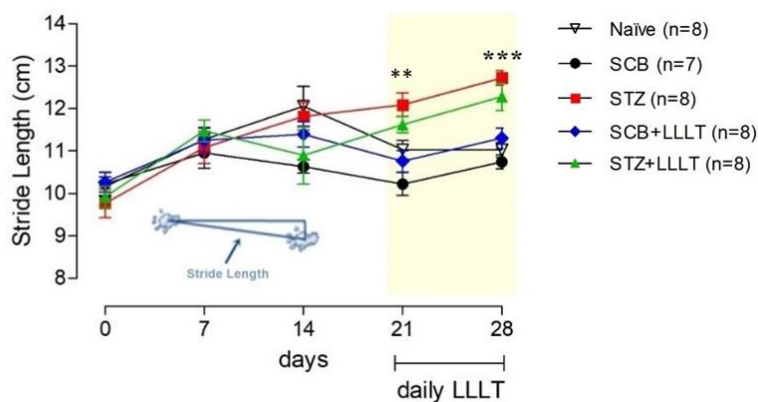


Figura 28. Efeito da LLLT sobre Comprimento da Pegada (*Stride Length*) (cm). O tratamento com LLLT não influenciou nos valores do Comprimento da Pegada (*Stride Length*) (cm), alterado no grupo STZ (**quadrados vermelhos**), no 21º e no 28º dia do protocolo experimental. Somente foram observadas diferenças significativas entre os grupos STZ+LLLT (**triângulos verdes**) e STZ, na comparação destes com os grupos controle (Naïve e SCB), no 21º ($p < 0,01$) e no 28º dia ($p < 0,001$) do protocolo experimental. ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolos (**) e (***) representam $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.8 Avaliação dos níveis de citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, CINC-1 e IL-10 por ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos submetidos à LLLT

5.8.1 TNF- α

Os níveis de citocinas foram avaliados a partir do homogenato dos GRDs L4-L5, coletados ao final do protocolo experimental, no 28º dia. Não houve diferença significativa na concentração de TNF- α entre os grupos, exceto para o grupo STZ+LLLT, o qual apresentou redução significativa ($p < 0,01$; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) de TNF- α em relação aos demais grupos (Naïve; SCB; STZ; SCB+LLLT), conforme observado na Figura 29.

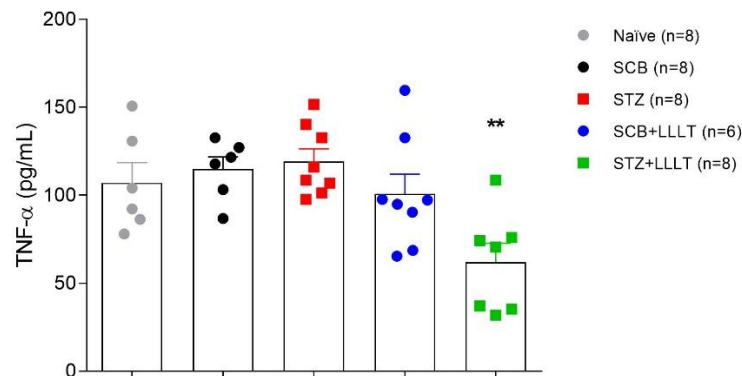


Figura 29. Efeito da LLLT sobre a concentração de TNF- α (pg/mL) nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos. Os ratos diabéticos neuropáticos (grupo STZ; **quadrados vermelhos**), não apresentaram alterações na concentração (pg/mL) da citocina pró-inflamatória TNF- α nos GRDs L4-L5, em comparação aos animais dos grupos Naïve (**círculos cinzas**), SCB (**círculos pretos**) e SCB+LLLT (**círculos azuis**). Entretanto, o grupo STZ+LLLT (**quadrados verdes**) apresentou redução significativa ($p < 0,01$) da concentração de TNF- α em relação aos demais grupos. ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolo (**) representa $p < 0,01$. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.8.2 *IL-1 β*

Diferentemente dos resultados obtidos quanto à concentração de TNF- α nos GRDs L4-L5, foi observado aumento significativo ($p < 0,05$; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) da concentração de IL-1 β no grupo STZ, quando comparado aos demais grupos (Naïve; SCB; STZ; SCB+LLLT). Da mesma maneira, o tratamento com LLLT entre o 21º e o 28º dia, foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) a concentração de IL-1 β em animais diabéticos neuropáticos (grupo STZ+LLLT), na comparação aos animais sem tratamento (grupo STZ), conforme mostra a Figura 30.

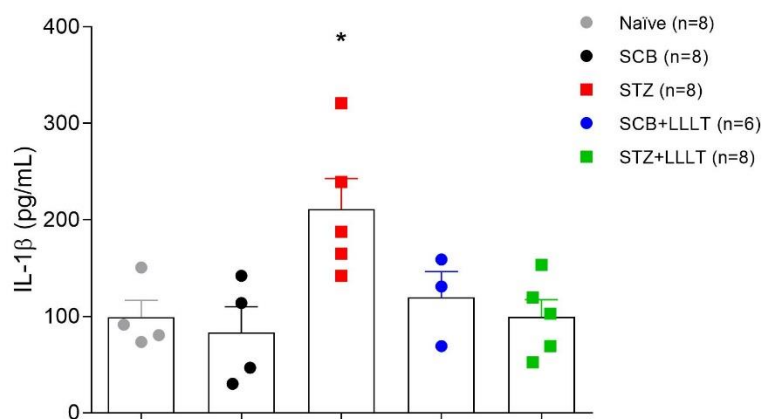


Figura 30. Efeito da LLLT sobre a concentração de IL-1 β (pg/mL) nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos. Foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração da citocina pró-inflamatória IL-1 β nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos (grupo STZ; **quadrados vermelhos**), em comparação aos demais grupos [Naïve (**círculos cinzas**); SCB (**círculos pretos**); SCB+LLLT (**círculos azuis**); STZ+LLLT (**quadrados verdes**)]. Da mesma maneira, a aplicação de LLLT entre o 21º e o 28º dia do protocolo experimental (grupo STZ+LLLT) foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) a concentração de IL-1 β nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos em comparação àqueles sem tratamento (grupo STZ). ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolo (*) representa $p < 0,05$. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.8.3 IL-6

No 28º dia do protocolo experimental não foram observadas alterações na concentração de IL-6 relacionadas à neuropatia diabética periférica (grupo STZ) nos GRDs L4-L5. Entretanto, os grupos SCB+LLLT e STZ+LLLT apresentaram concentração de IL-6 significativamente menor ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni), quando comparados ao grupo STZ, conforme observado na Figura 31.

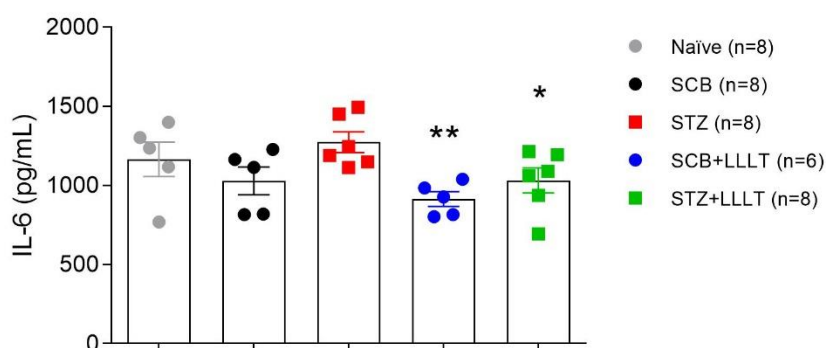


Figura 31. Efeito da LLLT sobre a concentração de IL-6 (pg/mL) nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos. Os ratos diabéticos neuropáticos (grupo STZ; **quadrados vermelhos**), não apresentaram alterações na concentração (pg/mL) da citocina pró-inflamatória IL-6 nos GRDs L4-L5, em comparação aos animais dos grupos Naïve (**círculos cinzas**) e SCB (**círculos pretos**). Entretanto, os grupos SCB+LLLT (**círculos azuis**) e STZ+LLLT (**quadrados verdes**) apresentaram redução significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) da concentração de IL-6 em relação ao grupo STZ. ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolos (*) e (**) representam $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.8.4 CINC-1

Similarmente aos níveis de IL-6, no 28º dia do protocolo experimental não foram observadas alterações na concentração de CINC-1 relacionadas à neuropatia diabética periférica (grupo STZ) nos GRDs L4-L5. Apenas o grupo SCB+LLLT apresentou concentração de CINC-1 significativamente menor ($p < 0,05$; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni), quando comparado aos demais grupos, conforme observado na Figura 32.

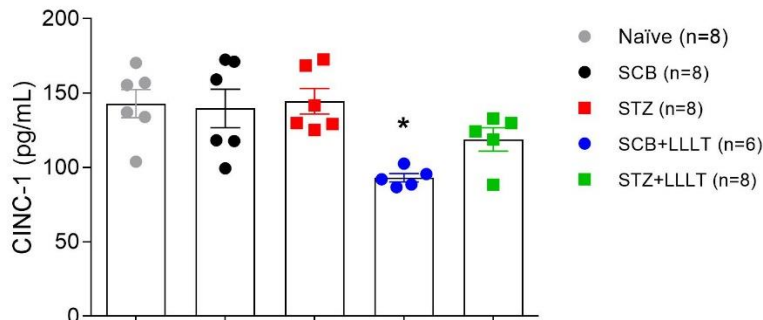


Figura 32. Efeito da LLLT sobre a concentração de CINC-1 (pg/mL) nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos. Os ratos diabéticos neuropáticos (grupo STZ; **quadrados vermelhos**), não apresentaram alterações na concentração (pg/mL) da citocina pró-inflamatória CINC-1 nos GRDs L4-L5, em comparação aos grupos Naïve (**círculos cinzas**), SCB (**círculos pretos**) e STZ+LLLT (**quadrados verdes**). Entretanto, o grupo SCB+LLLT (**círculos azuis**) apresentou redução significativa ($p < 0,05$) da concentração de CINC-1 em relação aos demais grupos. ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolo (*) representa $p < 0,05$. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.8.5 IL-10

Além da avaliação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e CINC-1, também foi realizada a análise da concentração da citocina anti-inflamatória IL-10 nos GRDs L4-L5. Foram observados níveis aumentados de IL-10 apenas no grupo STZ, em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni). Os níveis de IL-10 no grupo STZ+LLLT não diferiram dos grupos controle (Naïve; SCB; STZ; SCB+LLLT), conforme mostra a Figura 33.

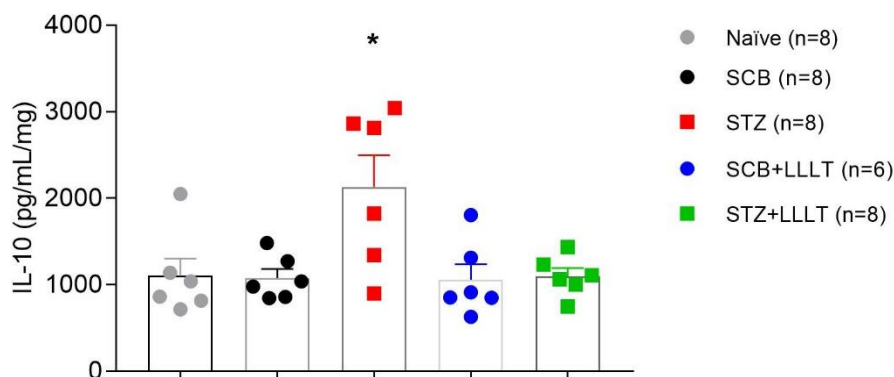


Figura 33. Efeito da LLLT sobre a concentração de IL-10 (pg/mL/mg) nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos. Houve aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração da citocina anti-inflamatória IL-10 nos GRDs L4-L5 de animais diabéticos neuropáticos sem tratamento (grupo STZ; **quadrados vermelhos**), em comparação aos demais grupos [Naïve (**círculos cinzas**); SCB (**círculos pretos**); SCB+LLLT (**círculos azuis**); STZ+LLLT (**quadrados verdes**)]. Da mesma maneira, a aplicação de LLLT entre o 21º e o 28º dia do protocolo experimental foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) a concentração de IL-10 nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos (grupo STZ+LLLT) em comparação àqueles sem tratamento (grupo STZ). ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolo (*) representa $p < 0,05$. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.9 Real time polymerase chain reaction (RT-qPCR) para quantificação dos genes codificadores de MAPKs nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos submetidos à LLLT

Previamente ao experimento de RT-qPCR, os *primers* para os genes-alvo e controles-endógenos foram testados com relação à sua eficiência, por meio da construção da curva padrão (*Standard curve*), realizada a partir de diluições seriadas de cDNA controle sintetizado a partir de 500 ng de RNA total (1:4 - 0,5; 1:8 - 0,25; 1:16 - 0,12; 1:32 - 0,06; 1:64 - 0,03) e concentração fixa de cada *primer* (100 nM). Foi observada alta eficiência para todos os *primers* (p38, ERK1/2, JNK e Serpinb6). O controle endógeno escolhido para normalização da expressão gênica relativa foi o Serpinb6 (NM_199085.2), o qual apresentou pouca variação dos valores de Ct na comparação entre os grupos, diferentemente do padrão observado na expressão do *housekeeping* Arfgef1 (NM_001277056.1). Os *primers* para

Serpinb6 apresentaram curva padrão satisfatória, com alta eficiência (99,9) e valor de r^2 de 0,98.

5.9.1 p38 mRNA

Na análise de expressão dos genes codificadores das MAPKs (p38, ERK1/2 e JNK) por RT-qPCR, foi identificada expressão diferencial de p38 mRNA no grupo STZ, estatisticamente superior aos demais grupos ($p < 0,05$; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni). O tratamento com LLLT (grupo STZ+LLLT) foi capaz de reduzir significativamente a expressão de p38 mRNA em relação ao grupo STZ ($p < 0,05$; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni), conforme observado na Figura 34.

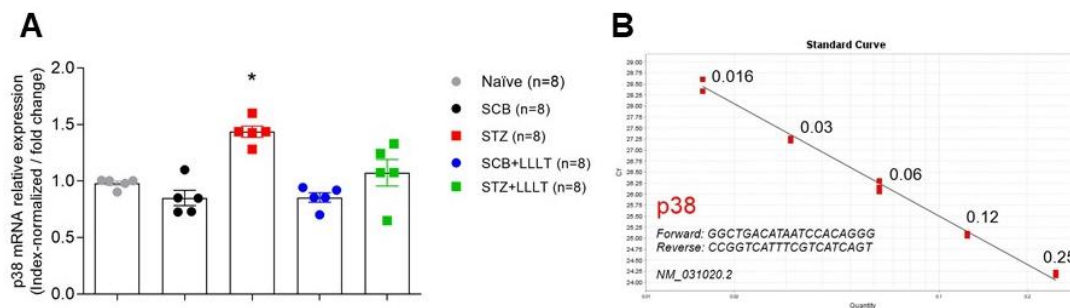


Figura 34. Expressão relativa de p38 mRNA por RT-qPCR. PAINEL A: O valor de expressão gênica é relativo ao grupo Naïve e foi normalizado pelo gene controle endógeno (*housekeeping*) Serpinb6 (NM_199085.2). O grupo STZ (**quadrados vermelhos**) apresentou expressão relativa significativamente maior ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos, incluindo o grupo STZ+LLLT (**quadrados verdes**). ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolo (*) representa $p < 0,05$. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). **PAINEL B:** Curva padrão mostrando a eficiência do *primer* para p38 na amplificação de diluições seriadas de cDNA. A curva foi construída a partir de diluições seriadas de cDNA controle sintetizado a partir de 500 ng de RNA total (1:4 - 0,5; 1:8 - 0,25; 1:16 - 0,12; 1:32 - 0,06; 1:64 - 0,03) e concentração fixa de cada *primer* (100 nM) (*forward* / *reverse*). A eficiência do *primer* para p38 foi de 98,145 e r^2 0,98.

5.9.2 ERK1/2 e JNK mRNA

Não houve diferença significativa na expressão relativa dos genes codificadores de ERK1/2 e JNK na comparação entre os grupos, conforme observado nas Figuras 35 e 36 (Painéis A). Os *primers* para ERK1/2 e JNK também apresentaram alta eficiência na amplificação das diferentes concentrações de cDNA controle (Figuras 35 e 36, Painéis B).

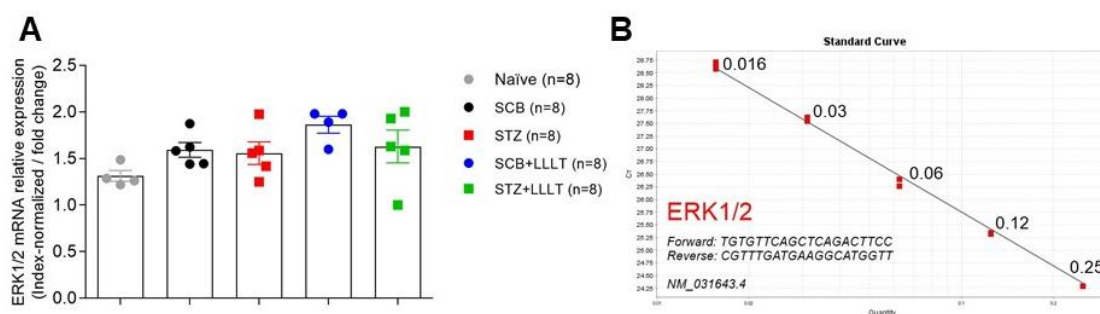


Figura 35. Expressão relativa de ERK1/2 mRNA por RT-qPCR. Painel A: O valor de expressão gênica é relativo ao grupo Naïve e foi normalizado pelo gene controle endógeno (*housekeeping*) Serpinb6 (NM_199085.2). Não foram observadas diferenças significativas na comparação entre os diferentes grupos experimentais. ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). **Painel B:** Curva padrão mostrando a eficiência do *primer* para ERK1/2 na amplificação de diluições seriadas de cDNA. A curva foi construída a partir de diluições seriadas de cDNA controle sintetizado a partir de 500 ng de RNA total (1:4 - 0,5; 1:8 - 0,25; 1:16 - 0,12; 1:32 - 0,06; 1:64 - 0,03) e concentração fixa de cada *primer* (100 nM) (*forward* / *reverse*). A eficiência do *primer* para ERK1/2 foi de 103,85 e r^2 0,97.

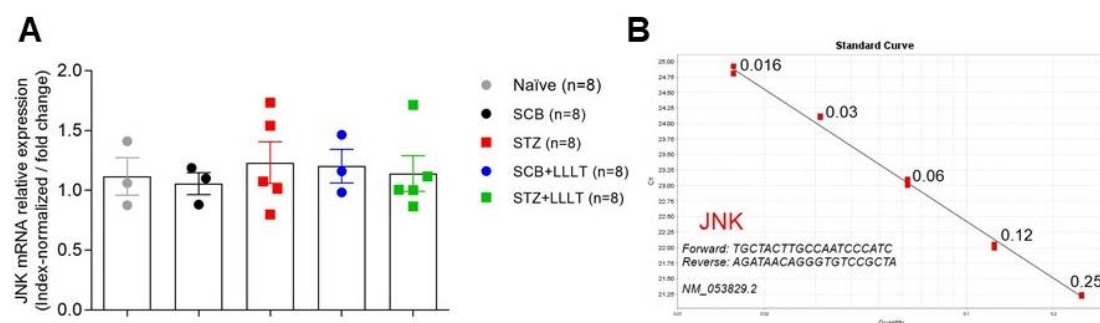


Figura 36. Expressão relativa de JNK mRNA por RT-qPCR. Painel A: O valor de expressão gênica é relativo ao grupo Naïve e foi normalizado pelo gene controle endógeno (*housekeeping*) Serpinb6 (NM_199085.2). Não foram observadas diferenças significativas na comparação entre os diferentes grupos

experimentais. ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). **Painel B:** Curva padrão mostrando a eficiência do *primer* para JNK na amplificação de diluições seriadas de cDNA. A curva foi construída a partir de diluições seriadas de cDNA controle sintetizado a partir de 500 ng de RNA total (1:4 - 0,5; 1:8 - 0,25; 1:16 - 0,12; 1:32 - 0,06; 1:64 - 0,03) e concentração fixa de cada *primer* (100 nM) (*forward* / *reverse*). A eficiência do *primer* para JNK foi de 111,07 e r^2 0,99.

5.10 Western blot para quantificação de MAPKs nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos submetidos à LLLT

Foi realizada a análise da expressão das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) p38, ERK1/2 e JNK, por meio de ensaio de Western blot (WB), tanto das proteínas em sua forma total, quanto nas formas fosforiladas (p-p38; pERK1/2; pJNK), que correspondem, nesse caso, às proteínas em seu estado ativo. Devido a dificuldades técnicas na padronização do WB envolvendo anticorpos para proteínas fosforiladas, apenas foi concluída a análise da proteína ERK1/2 e das suas duas bandas individualmente, p44 e p42. A Figura 37 apresenta a média da densidade óptica (em unidades arbitrárias) relativa à ERK1/2 fosforilada e normalizada pela quantidade de proteína total (pERK1/2 dividida pela ERK1/2). Não houve diferenças significativas na comparação entre os grupos, de modo que a neuropatia diabética periférica não afetou a expressão de ERK1/2. Da mesma maneira, o tratamento com LLLT não apresentou efeitos sobre a expressão desta proteína nos grupos STZ+LLLT e SCB+LLLT.

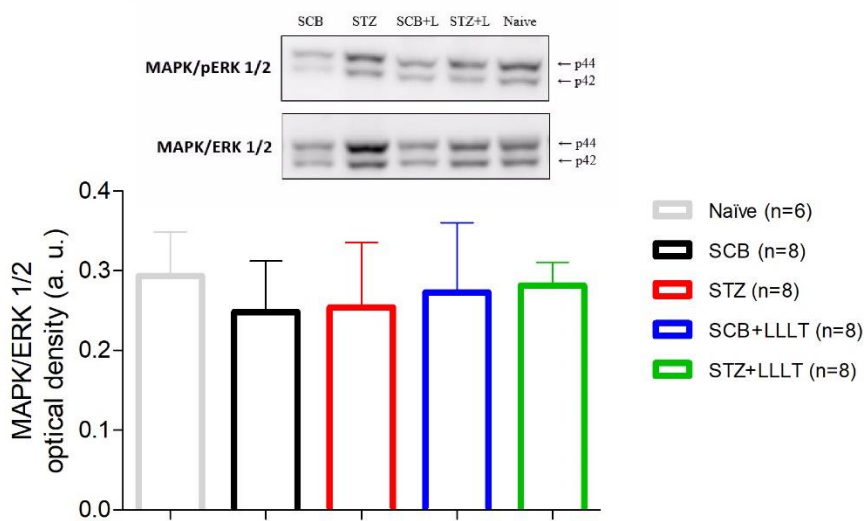


Figura 37. Detecção da MAPK ERK1/2 por Western blot. Foi analisada a média da densidade óptica (em unidades arbitrárias) de ambas isoformas da proteína ERK1/2 (p44/p42) e utilizada a razão entre a expressão da forma fosforilada (pERK1/2) pela expressão da proteína total (ERK1/2). A quantificação foi realizada a partir da densidade óptica das bandas p44 e p42 da proteína pERK1/2 (forma fosforilada, acima; MAPK/pERK1/2) e da ERK1/2 (forma total, abaixo; MAPK/ERK1/2), respectivas aos grupos Naïve (**barra cinza**), SCB (**barra preta**), STZ (**barra vermelha**), SCB+LLLT (**barra azul**) e STZ+LLLT (**barra verde**). Não houve diferenças significativas entre os grupos na expressão de ERK1/2. ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

Além da quantificação com base na média entre as duas bandas (p44 e p42) da proteína ERK1/2, cada isoforma foi também analisada separadamente. Assim como na análise da média total, não observamos diferenças significativas na densidade óptica (em unidades arbitrárias) entre os grupos, tanto para p44 quanto para p42, conforme observado na Figura 38 (Panéis A e B).

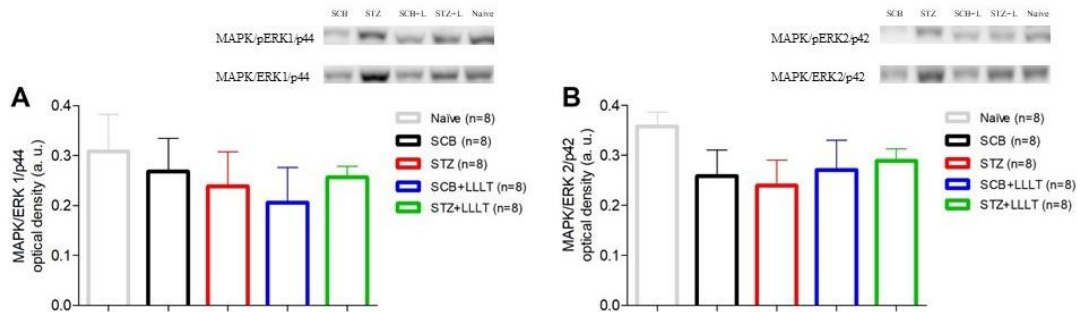


Figura 38. Detecção de MAPK/ERK1/2 (p44 e p42) por Western blot. Foi analisada a média da densidade óptica (em unidades arbitrárias) de ambas isoformas da proteína ERK1/2 (p44/p42) separadamente e utilizada a razão entre a expressão da forma fosforilada (pERK1 e pERK2) pela expressão da proteína total (ERK1 e ERK2). Assim como na análise realizada a partir da média entre as duas bandas, a densidade óptica de cada banda, individualmente, não apresentou diferenças significativas na comparação entre os grupos para expressão de ERK1 (p44) (**Painel A**) e ERK2 (p42) (**Painel B**). ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.11 Imunofluorescência para detecção de MAPKs nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos submetidos à LLLT

Foi realizada imunofluorescência dos GRDs L4-L5 para detecção das proteínas p-p38, p-ERK1/2 e p-JNK, complementares ao experimento de Western blot. Previamente, observamos que a expressão do p38 mRNA, por meio do experimento de RT-qPCR, está aumentada no grupo STZ. Além disso, também verificamos que a LLLT foi capaz de reduzir a expressão deste gene de maneira significativa. As imagens de imunofluorescência dos GRDs L4-L5, para detecção protéica, mostram aumento da presença de p38 fosforilada (p-p38) no grupo STZ (animais diabéticos neuropáticos sem tratamento) (Figura 39 f), quando comparada aos demais grupos, inclusive ao STZ+LLLT, que também apresenta marcação para p-p38, mas em número menor de neurônios (Figura 39 j).

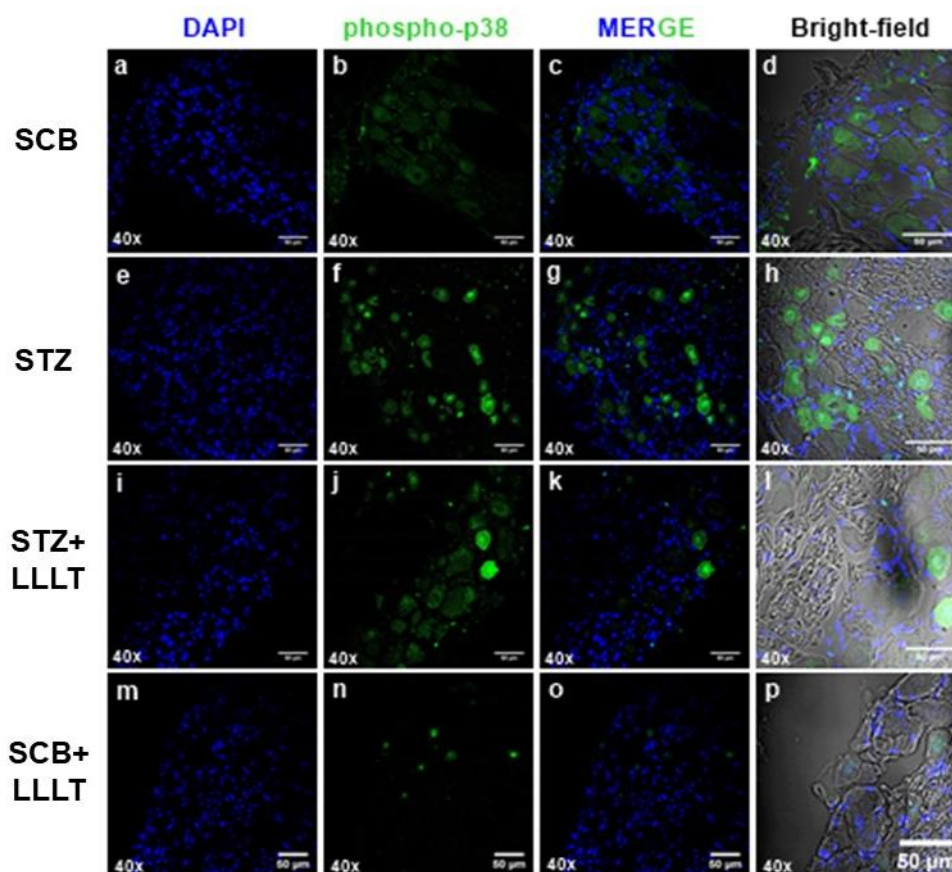


Figura 39. Imunofluorescência dos GRDs L4-L5 para marcação da forma fosforilada de p38 (p-p38). Lâminas com cortes transversais (14 µm) de GRDs L4-L5 dos grupos SCB, STZ, STZ+LLLT e SCB+LLLT, foram submetidas ao protocolo de imunofluorescência com utilização de anticorpo* para marcação de p-p38 (**b-f-j-n**). Núcleos celulares foram corados com DAPI (**a-e-i-m**). Todas as lâminas constituem de cortes feitos a partir de gânglios L4-L5 extraídos no 28º dia do protocolo experimental. Houve forte marcação de p-p38 no grupo STZ (**f**) em comparação ao grupo SCB (**b**). O tratamento com LLLT foi capaz de reduzir parcialmente o número de neurônios com marcação positiva para p-p38 (grupo STZ+LLLT) (**j**). *O anti-phospho-p38 detecta níveis endógenos de p38 MAPK somente quando fosforilada em Thr180 e Tyr182. Este anticorpo não promove reação cruzada com as formas fosforiladas de p42/44 MAPK ou SAPK/JNK. Aumento de 40x. Escala 50 µm.

Para as demais proteínas (p-ERK1/2 e p-JNK), houve marcação fraca em todos os grupos experimentais, especialmente nos grupos expostos à LLLT (STZ+LLLT e SCB+LLLT), conforme observado nas Figuras 40 **b-f-j-n** e 41 **b-f-j-n**, a seguir.

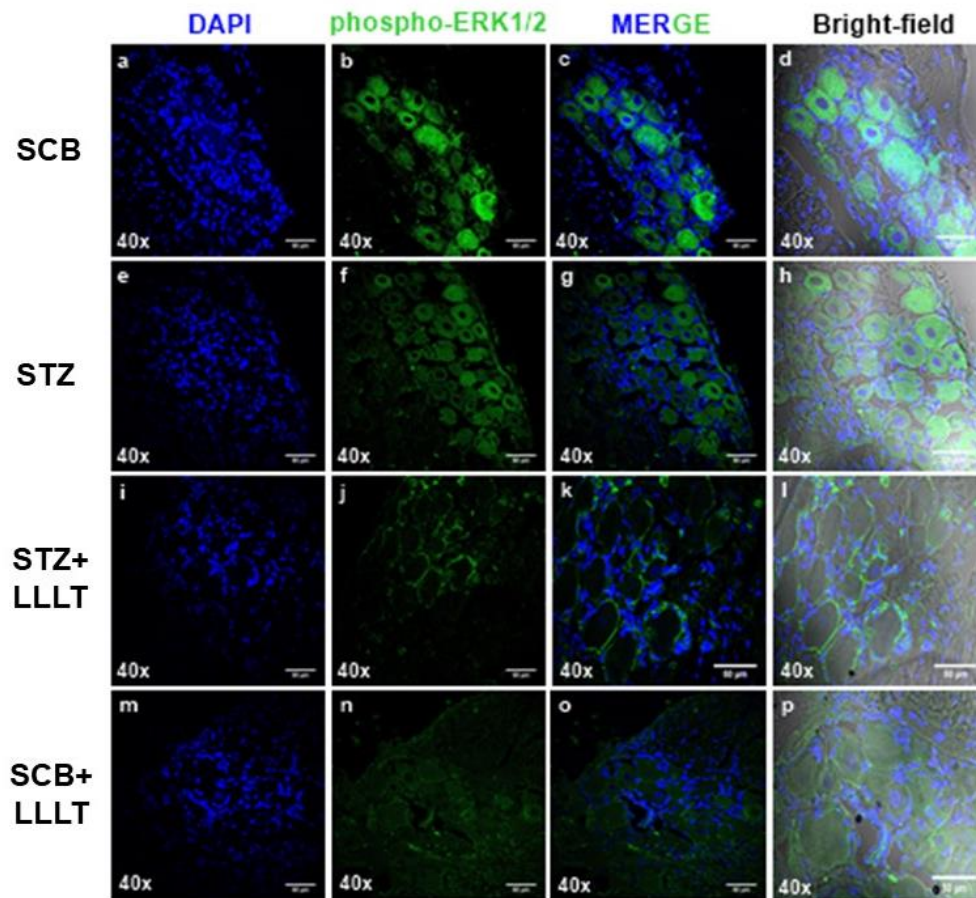


Figura 40. Imunofluorescência do GRDs L4-L5 para marcação da forma fosforilada de ERK1/2 (p-ERK1/2). Lâminas com cortes transversais (14 µm) de GRDs L4-L5 dos grupos SCB, STZ, STZ+LLLT e SCB+LLLT, foram submetidas a protocolo de imunofluorescência com utilização de anticorpo* para marcação de p-ERK1/2 (**b-f-j-n**). Núcleos celulares foram corados com DAPI (**a-e-i-m**). Todas as lâminas constituem de cortes feitos a partir de gânglios L4-L5 extraídos no 28º dia do protocolo experimental. Há fraca marcação em todos os grupos experimentais, especialmente em STZ+LLLT (**j**) e SCB+LLLT (**n**). *O anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) detecta níveis endógenos de p44 e p42 quando dualmente fosforilados em Thr202 e Tyr204. Este anticorpo não reage de maneira cruzada com os correspondentes resíduos fosforilados de JNK/SAPK ou p38 MAPKs. Aumento de 40x. Escala 50 µm.

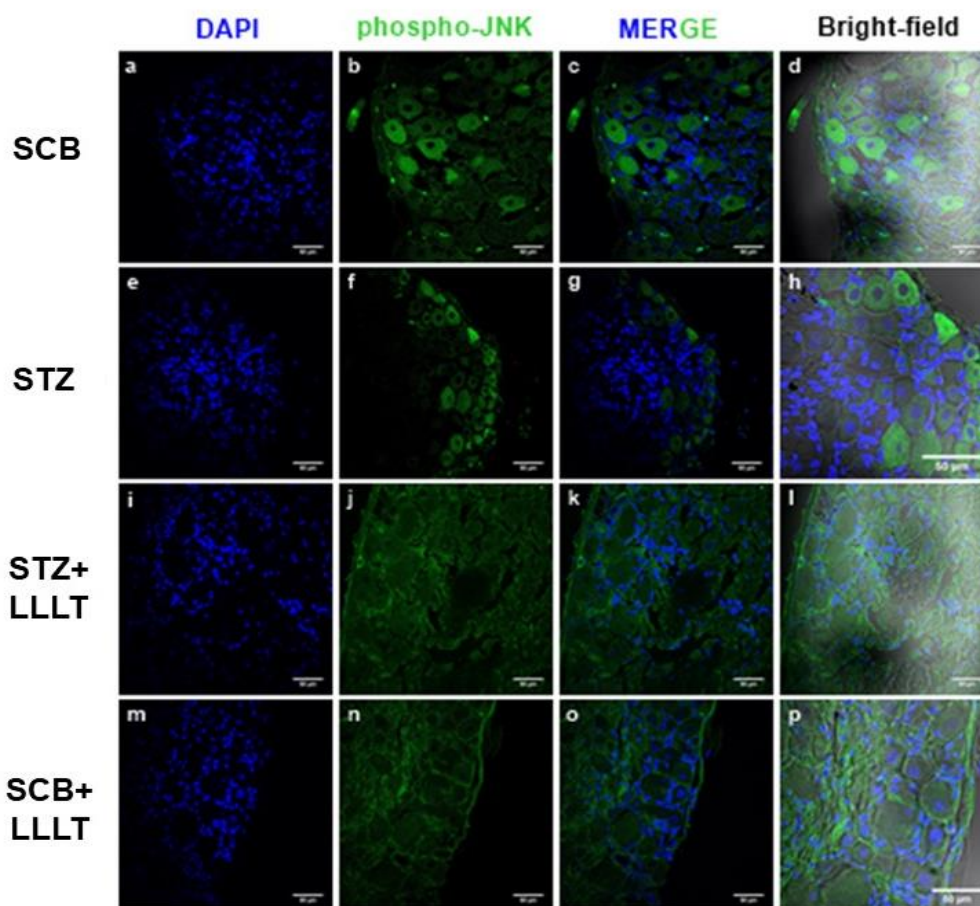


Figura 41. Imunofluorescência dos GRDs L4-L5 para marcação da forma fosforilada de JNK (p-JNK). Lâminas com cortes transversais (14 µm) de GRDs L4-L5 dos grupos SCB, STZ, STZ+LLLT e SCB+LLLT, foram submetidas a protocolo de imunofluorescência com utilização de anticorpo* para marcação de p-JNK (**b-f-j-n**). Núcleos celulares foram corados com DAPI (**a-e-i-m**). Todas as lâminas constituem de cortes feitos a partir de gânglios L4-L5 extraídos no 28º dia do protocolo experimental. Há fraca marcação em todos os grupos experimentais, especialmente em STZ+LLLT (**j**) e SCB+LLLT (**n**). *O *anti-phospho-SAPK/JNK* (Thr183/Tyr185) detecta níveis endógenos de p46 e p54 SAPK/JNK quando dualmente fosforilados em Thr183 e Tyr185. Este anticorpo não reconhece níveis endógenos de p44/42 ou p38 MAPKs. Aumento de 40x. Escala 50 µm.

5.12 Espectroscopia Raman para caracterização dos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos submetidos à LLLT

A espectroscopia Raman foi utilizada como uma nova ferramenta, a fim de investigar a condição patológica da neuropatia diabética periférica, a nível de possíveis alterações nas ligações químicas dos GRDs L4-L5. O objetivo desta parte do estudo foi, inicialmente, caracterizar as identidades espectrais dos GRDs de ratos diabéticos hiperalgésicos e, a partir disso, os efeitos da LLLT sobre os respectivos espectros. Por meio de aquisição dos espectros Raman, a partir de uma região plana do GRD (Figura 42, Painel A), foram identificados picos característicos dos GRDs L4-L5: 2704 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 2885 cm^{-1} , 2940 cm^{-1} , 3061 cm^{-1} e 3160 cm^{-1} , que correspondem a estiramentos simétricos e assimétricos CH_2/CH_3 , e vibrações C-H em lipídeos e proteínas (Figura 42, Painel B).

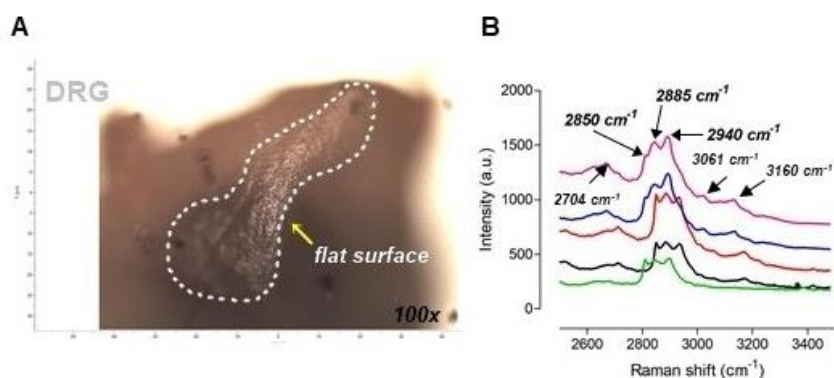


Figura 42. Espectroscopia Raman dos GRDs L4-L5. Painel A: O laser de excitação ($\lambda = 532\text{ nm}$) foi incidido diretamente sobre uma região “plana” de cada gânglio íntegro, sendo realizadas três leituras dentro da área demarcada pela linha branca pontilhada (*flat surface*); objetiva de 100x; grade 1800 gr/mm; filtro 10 %; slit 100 μm ; abertura de 300 μm . **Painel B:** sobreposição dos espectros representativos de cada grupo experimental, como resultado da média de 24 espectros por grupo. As variações de *baseline* foram corrigidas por meio de um código ALSS (*Asymmetric Least Squares Smoothing*), executado em Spyder (Python 3.6, Python Software Foundation, <https://www.python.org/>). Foram observados picos principalmente em 2704 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 2885 cm^{-1} , 2940 cm^{-1} , 3061 cm^{-1} e 3160 cm^{-1} (**setas pretas**). Estas regiões de banda referem-se às ligações CH_2 e CH_3 , típicas de lipídeo e proteína, encontradas em tecido nervoso periférico e corpos celulares de neurônios do GRD. (a. u.) = unidades arbitrárias.

Os GRDs L4-L5 dos ratos diabéticos hiperalgésicos (grupo STZ), apresentaram aumento da intensidade do espectro nos picos 2704 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 2885 cm^{-1} e 3160 cm^{-1} . Estes mesmos picos tiveram suas intensidades reduzidas após o tratamento com LLLT (grupo STZ+LLLT, aqui chamado de STZ+PBMT), acompanhando o efeito anti-hiperalgésico da terapia.

Os resultados da caracterização dos GRDs L4-L5 por espectroscopia Raman nos diferentes grupos experimentais, bem como os efeitos da LLLT sobre as identidades espectrais adquiridas, foram publicados na revista científica “*Journal of Biophotonics*” (DOI: 10.1002/jbio.201900135). O respectivo artigo científico encontra-se a seguir.

5.12.1 Raman spectroscopy of dorsal root ganglia from streptozotocin-induced diabetic neuropathic rats submitted to photobiomodulation therapy

FULL ARTICLE

Raman spectroscopy of dorsal root ganglia from streptozotocin-induced diabetic neuropathic rats submitted to photobiomodulation therapy

Willians F. Vieira¹  | Silviane F. de Magalhães¹ | Felipe H. Farias¹ |
André A. de Thomaz² | Carlos A. Parada^{1*} 

¹Laboratory for Pain Studies, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

²Department of Quantum Electronics, Institute of Physics Gleb Wataghin, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

*Correspondence

Carlos A. Parada, Laboratory for Pain Studies, Carl von Linnaeus n/n, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Sao Paulo 13083-864, Brazil.
Email: caparada@unicamp.br

Funding information

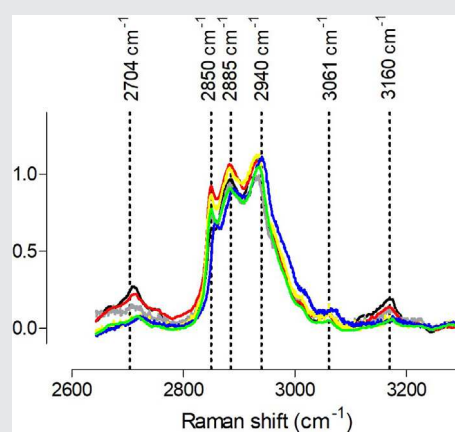
Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES); São Paulo Research Foundation (FAPESP), Grant/Award Numbers: #2018/05108-8, #2015/12673-5, #2014/25153-7

Abstract

In this study, we used Raman spectroscopy as a new tool to investigate pathological conditions at the level of chemical bond alterations in biological tissues. Currently, there have been no reports on the spectroscopic alterations caused by diabetic neuropathy in the dorsal root ganglia (DRG). DRG are a target for the treatment of neuropathic pain, and the need for more effective therapies is increasing. Photobiomodulation therapy (PBMT) through infrared low-level laser irradiation (904 nm) has shown analgesic effects on the treatment of neuropathy. Thus, the aim of this study was to use Raman spectroscopy to characterize the spectral DRG identities of streptozotocin (STZ)-induced diabetic neuropathic (hyperalgesic) rats and to study the influence of PBMT over such spectra. Characteristic DRG peaks were identified at 2704, 2850, 2885, 2940, 3061 and 3160 cm^{-1} , whose assignments are CH_2/CH_3 symmetric/asymmetric stretches, and C–H vibrations of lipids and proteins. DRG from hyperalgesic rats showed an increased normalized intensity of 2704, 2850, 2885 and 3160 cm^{-1} . These same peaks had their normalized intensity reduced after PBMT treatment, accompanied by an anti-hyperalgesic effect. Raman spectroscopy was able to diagnose spectral alterations in DRG of hyperalgesic rats and the PBMT reduced the intensity of hyperalgesia and the altered Raman spectra.

KEYWORDS

diabetic neuropathy, dorsal root ganglia, hyperalgesia, photobiomodulation, Raman spectroscopy



1 | INTRODUCTION

Type I diabetes is one of the most common endocrine disorders and can be accompanied by several chronic complications [1]. Diabetes can damage the peripheral nervous system (PNS) sensory nerves of the dorsal root ganglia (DRG), including the ensheathing satellite cells and Schwann cells [2–7]. Hyperglycemia is the most important signal of the non-treated diabetes (both types, 1 and 2) and could impair the PNS in a variety of ways [8]. The excess of glucose leads to glycolysis and several hyperglycemia-induced mitochondrial dysfunctions, with impaired adenosine triphosphate (ATP) synthesis. In parallel, there is an increase in the flux through the polyol pathway, cellular osmolarity, and reduced levels of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, culminating in oxidative stress, inflammatory injury, and generation of advanced glycation end products (AGEs) via attachment of reactive carbohydrate groups to proteins, lipids or nucleic acids [6, 9–11].

Due to the high complexity of the diabetic neuropathy syndrome and the severity of pain, it remains undertreated. Current first-line pharmacological therapies to control diabetic neuropathy involve anticonvulsants, serotonin-noradrenaline reuptake inhibitors and tricyclic antidepressants, but with limited efficacy [12–14]. Thus, alternative non-pharmacological treatments are emerging [6], such as photobiomodulation therapy (PBMT), which has been applied to treat various types of neuropathic pain [15–18]. Previously referred as low-level laser therapy, PBMT can modulate inflammatory processes, as described in several studies involving acute nerve [19, 20], and muscle injuries [21–24], among others. PBMT effectiveness is based on the interaction between infrared light and mitochondria, resulting in an increase of the electrochemical proton gradient and, consequently, in ATP synthesis, calcium uptake, oxygen consumption, and reactive oxygen species production [25, 26].

Raman spectroscopy has been used to study chemical compositions in cells and tissues, based on interaction with the vibrational modes from molecular bonds in the sample [27]. Alterations of molecular signatures in a cell or tissue undergoing disease transformation can be detected by Raman scattering in a noninvasive way and without labelling [28, 29]. Great emphasis has been given to the spectral study of cancer in several organs, such as cervix [30–32], skin [33–35], gastrointestinal tract [36–39] and others [40–42]. There are few studies regarding identities of Raman spectra of the nervous system, in particular the PNS which is central to diabetic neuropathic pain [41, 43–48]. At this time, there have been no studies spectroscopically characterizing the biochemical alterations promoted by peripheral diabetic neuropathy involving the DRG. On this basis, the aim of this

study was to identify the characteristic spectra of DRG and then compare them with those from neuropathic hyperalgesic rats, submitted or not to the treatment with PBMT.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Ethics statement and animals

All experiments were performed in accordance with the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONSEA) and the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) guidelines. Experiments were also approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Use (CEUA/UNICAMP, protocol no. 3902-1) and followed the ARRIVE guidelines. Forty-eight male Lewis rats (LEW/HsdUnib, Harlan, 1996), 4- to 8-week-old, weighing 200 to 250 g, provided by the University's Multidisciplinary Center for Biological Research (CEMIB) were used. Rats were maintained in plastic cages (four per cage) and received food and water ad libitum, in a temperature- and humidity-controlled room, under a 12/12 hours dark/light cycle.

The design parameters of the experimental groups were set up as the following: Six experimental groups of rats were divided randomly ($n = 8$ per group). The first group, Naïve, healthy rats that received no injection and no PBMT treatment. The second group, SCB, received five doses of vehicle 0.1 M sodium citrate buffer (SCB) and no PBMT treatment. The third group, STZ, received five doses of streptozotocin (STZ), 25 mg/kg, and no PBMT treatment. The fourth group, Naïve + PBMT, received no injection and were submitted to PBMT treatment. The fifth group, SCB + PBMT, received five doses of vehicle 0.1 M SCB and included PBMT treatment. The sixth group, STZ + PBMT, received five doses of STZ, 25 mg/kg, also including PBMT treatment. The experimental design is shown in Table 1.

2.2 | Multiple streptozotocin injections

Five low-doses of STZ (25 mg/kg) (N-(methylnitrosocarbamoyl)- α -D-glucosamine; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), diluted in 0.1 M SCB (pH 4.5), were administered intraperitoneally once a day for five consecutive days. The control animals were administered the same dose of vehicle (0.1 M SCB). The daily injection volume ranged from 50 to 62.5 μ L (according to the weight of rats). Blood extracted from the rat tail veins was used to make glucose measurements with an *Accu-Chek Sensor Comfort* (Roche Diagnostics, Germany). Monitoring the development of hyperglycemia and the weight of the rats was performed at days 0, 7, 14, 21, 24 and 28 after starting the STZ and vehicle injections (see Table 1 for experimental design).

TABLE 1 Experimental design

Experimental design								
48 Lewis rats (n = 8 per group)	Days →	0	1-5	7 and 14	19	21	24	28
	Naïve	Basal glycemia, weight and von Frey measurements		Glycemia, weight and von Frey measurements		Glycemia, weight, and von Frey measurements; 1 day of PBMT (Naïve + PBMT; SCB + PBMT; STZ + PBMT groups)	Glycemia, weight and von Frey measurements; 4 day of PBMT (Naïve + PBMT; SCB + PBMT; STZ + PBMT groups)	Glycemia, weight, and von Frey measurements; 8 day of PBMT (Naïve + PBMT; SCB + PBMT; STZ + PBMT groups), Euthanasia/DRG collection
	SCB (vehicle injections)		0.1 M sodium citrate buffer (vehicle) or streptozotocin (25 mg/kg) injections (1 low-dose per day; except Naïve + PBMT)					
	STZ (streptozotocin injections)							
	Naïve + PBMT (no injection + PBMT)							
	SCB + PBMT (vehicle injections + PBMT)							
	STZ + PBMT (streptozotocin injections + PBMT)							
	hyperalgesic rats ^a				Selection of			

All of the experimental procedures had approval by the UNICAMP's Ethic Committee (protocol number: 3902-1) and were within compliance with National and International Animal Care Guidelines.

^aNon-hyperalgesic rats from STZ and STZ + PBMT groups were not considered for this study; from 21 to 28 days, one PBMT session was performed per day, followed by electronic von Frey test after anesthesia recovery; glycemia and weight were measured during anesthesia, preceding the PBMT session; gray-filled frames = no intervention at the specific period.

2.3 | von Frey test: Mechanical withdrawal thresholds

The development of hyperalgesia was determined by the mechanical withdrawal threshold by applying the electronic von Frey test (Insight, Ribeirão Preto, Brazil). It was performed with a polypropylene pipette tip adapted to a hand-held force transducer with crescent pressure in the plantar surface of the right and left hind paws of the rats. The equipment transduces an automatic pressure action on the mid-plantar area of the paw. The measurement obtained from the surface area results in units of gram-force (g) when the paw is withdrawn. Rats were randomly placed into individual plastic cages with a metal mesh floor, followed by 10 minutes of acclimatization prior the test. Electronic von Frey tests were applied to all experimental groups at 0, 7, 14, 21, 24 and 28 days after starting the STZ or vehicle injections, always in the mid-morning period, by a blind-examiner to the groups and treatment. For STZ + PBMT group, an additional analysis was done at 19 days after starting the STZ injections, to select only hyperalgesic rats for the PBMT treatment. No analgesic medicine was given to rats during the entire study.

2.4 | PBMT through low-level laser irradiation

Rats from group four Naïve + PBMT, group five SCB + PBMT and group six STZ + PBMT were submitted to PBMT during 8 days (from 21st to 28th day after starting the STZ or vehicle injections), once a day, and always in the morning. For the STZ + PBMT group six, only hyperalgesic rats were considered (selected as described in Section 2.3) to receive the laser treatment, once in our diabetic neuropathy model, about 20% of the rats receiving STZ injections did not become hyperalgesic (data not shown). Before the rats received PBMT treatment, an anesthetic, Isoflurane (3%) (Cristália, Itapira, Brazil), was used. The irradiation thus was directly applied to carefully shaved areas located on the dorsal side, between L4/L5 spine levels, bilaterally. An Endophoton LLT 1307 (KLD Biosistemas Equip. Elet. Ltda, Amparo, Brazil) class IIIB laser device was used to perform

the PBMT treatment. Table 2 gives a description of the laser parameters.

2.5 | Dorsal root ganglia collection

On the 28th day, upon completing the last period of the laser irradiation and mechanical withdrawal threshold analysis (von Frey test), rats were anesthetized under Isoflurane (3%) (Cristália, Itapira, Brazil) and humanely euthanized. By dissection, the L4 and L5 DRG were collected and immediately frozen in liquid nitrogen (-196.15°C) until the time of Raman spectroscopy analysis.

2.6 | Raman spectroscopy analysis

Raman spectra were measured from the flattest DRG surface taken from one ganglion per animal, randomly selected between L4 and L5. DRG were then removed from liquid nitrogen (-196.15°C) and left drying minutes before the analysis. Triplicate measurements were made from each ganglion, resulting in 24 spectra per group. Raman spectra were acquired using a LabRam Aramis Instrument (Horiba Jobin-Yvon, Kyoto, Japan), by excitation with a 532-nm laser, focused on the sample through $\times 10$ eyepiece and $\times 100$ microscope objective lens. We set the equipment at 1800 gr/mm grade, 10% filter and the entrance slit of the spectrometer was set to 100 μm . The acquisition time of a single spectrum was about 277.40 seconds. Spectral data were exported to a computer and baseline corrections were done by the Asymmetric Least Squares Smoothing code [50], adapted by A.A.T. and executed on Spyder (Python 3.6, Python Software Foundation, <https://www.python.org/>). The plotting of Raman peaks were on the X -axis consisting of Raman shift (cm^{-1}) and arbitrary intensity were on the Y -axis (Raman intensity, a.u.).

2.7 | Statistical analysis

For comparisons between groups and time of treatment, we used two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc test. We made other comparisons

Laser	Wavelength	Power	Output	Irradiance
Gallium-arsenide	904 nm	70 mW	0.001 cm^2	7000 mW/cm^2
Emission mode	Total energy	Time	Contact	Treated area
Continuous	2.03 J	29" per point	Direct	1.0 cm^2

TABLE 2 Laser parameters used for photobiomodulation therapy (PBMT)

All PBMT parameters followed the WALT (World Association for Laser Therapy) recommendations [49].
("), seconds; cm^2 , square centimeters; J, Joule; mW, milliWatts; mW/cm^2 , milliWatts per square centimeter; nm, nanometers.

between three or more groups. An one-way ANOVA, also followed by Bonferroni post-hoc test, allowed for this achievement. For comparisons between two groups only, we used an unpaired *t* test and $P < .05$ was considered statistically significant. Principal component analysis (PCA) routine was implemented using the OriginPro 2019 (OriginLab Corporation) software, and applied to all obtained Raman spectra. Linear discriminant analysis (LDA) was implemented using the scikit-learn (<https://scikit-learn.org/stable/index.html>) package for Python language. In order to perform our statistical analysis, we used GraphPad Prism Version 5 software (GraphPad Software, San Diego, California). Numerical values were expressed as mean $\pm$ SEM.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

As a starting point, we looked to identify specific peaks as characteristic spectra of Naïve DRG tissue to compare it with those collected from diabetic neuropathic (hyperalgesic) rats. In addition, we analyzed the effects of PBMT over both “healthy” and “altered” DRG Raman spectra. Results are thoroughly described and discussed in Sections 3.1 to 3.4.

3.1 | Streptozotocin-induced hyperglycemia on rats

As shown in Figure 1, all rats that received STZ injections became hyperglycemic (plasma glucose ≥ 250 mg/dL) until 48 hours after the last injection and failed to gain weight over time. Upon close observation, other typical signs of type 1 diabetes mellitus emerged such as polydipsia, polyuria and polyphagia (data not shown). PBMT was not able to alter the levels of hyperglycemia or prevent the failure in weight gain. Rats from Naïve, SCB, Naïve + PBMT and SCB + PBMT groups did not present metabolic alterations. All animals remained alive during the entire study.

Patients with untreated diabetic neuropathy develop a gradual and insidious damage to the sensory peripheral nerves, which also involves the neuronal cell bodies, located in the DRG [51, 52]. Satellite cells and the DRG neuronal cell bodies form a functional unit and as such contribute to the functioning of DRG in disease (for review, see Reference [7]). Thus, the DRG are affected early by diabetic neuropathy, especially by microvascular ischemia, AGEs, inflammatory cytokines, increased aldose reductase activity, and oxidative stress [6, 8–11], conferring many biochemical and morphological changes [53]. The same is observed during peripheral nerve injuries, where it is possible to observe changes in neuropeptide expression, satellite cell proliferation and delayed death of small neurons, including the late appearance of immune cells [54]. As a consequence, DRG

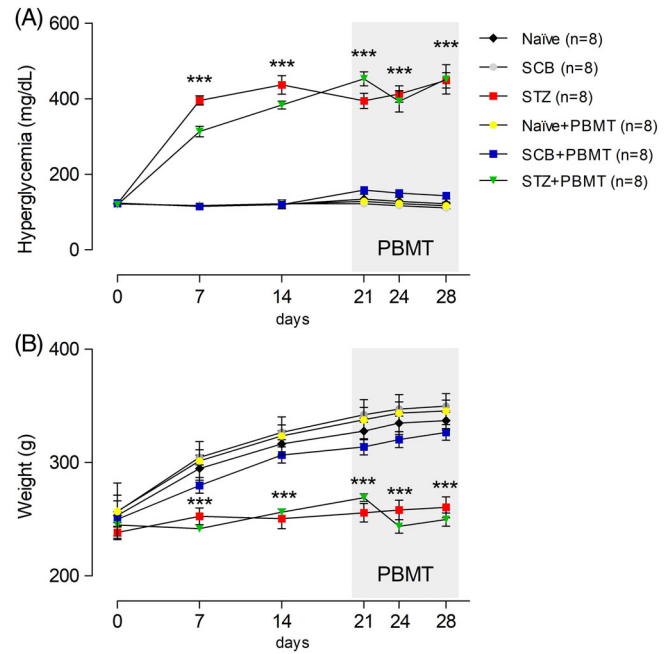


FIGURE 1 Hyperglycemia development and weight maintenance. Panel A: At the seventh day after starting the STZ five low-doses protocol, rats from STZ and STZ + PBMT groups showed high levels of hyperglycemia compared to those receiving vehicle injections (0.1 M sodium citrate buffer) ($P < .001$; two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test). Panel B: Hyperglycemic rats failed to gain weight and maintained the same values of the baseline period. Meanwhile, rats from control groups (Naïve; Naïve + PBMT; SCB; SCB + PBMT) continued gaining weight up to 28 days. The symbol (***) means significant difference between hyperglycemic (STZ and STZ + PBMT) and control groups (Naïve; Naïve + PBMT; SCB; SCB + PBMT). Data are expressed as mean $\pm$ SEM; n = number of rats per group; mg/dL = milligrams per deciliter; g = grams; PBMT, photobiomodulation therapy; STZ, streptozotocin

are important pharmacological targets for analgesic and anti-inflammatory drugs, including blockade of pro-inflammatory cytokines or complement cascade, and treatment with inhibitors of microglial activation [54, 55].

In summary, diabetic neuropathy is considered a highly complex syndrome and no current pharmacological interventions are effective [6]. PBMT applied to the L4/L5 DRG region appears to modulate the inflammatory process related to peripheral diabetic neuropathy, as we have seen in other studies in our laboratory, regarding the reduction of pro-inflammatory cytokines concentration and mitogen-activated protein kinases expression after PBMT treatment (unpublished data).

3.2 | The anti-hyperalgesic effect of PBMT

After selection of the neuropathic hyperalgesic rats (at the 19th day), they were submitted to the PBMT treatment once

a day during the period between the 21st and 28th day. As shown in Figure 2, there was a significant reduction ($P < .001$) in the intensity of hyperalgesia (Δ withdrawal threshold, g) of PBM-treated rats (STZ + PBMT) when compared to STZ group without treatment, at 24 and 28 days after starting the injections of STZ and vehicle (two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test).

It has been demonstrated that treatment with PBMT (808 nm; 20 and 40 J/cm²; 30 mW; 1 W/cm²) reduces hyperalgesia in a model of neuropathic pain induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve [56]. The anti-hyperalgesic effect of PBMT has been shown also in postoperative pain, and in this case was applied by a gallium-aluminum-arsenate (GaAlAs) 830 nm low-intensity laser (3 and 8 J/cm²; 30 mW) on a rat plantar incision [57]. However, studies involving the effects of PBMT in STZ-induced diabetic neuropathy are not very common in the literature. da Silva Oliveira et al [58] showed antinociceptive properties of PBMT (660 nm; 30 mW; 1.6 J/cm²) on diabetes-induced peripheral neuropathy by restoring axonal morphology and mitochondrial functionality in mice. Not all of the cited works, among others that used STZ-induced diabetic neuropathy, focused on DRG; none used vibrational spectroscopy analysis.

3.3 | Raman characterization of DRG

Investigations into DRG pathology in human diabetes are lacking because human DRG biopsies are not ethical to carry

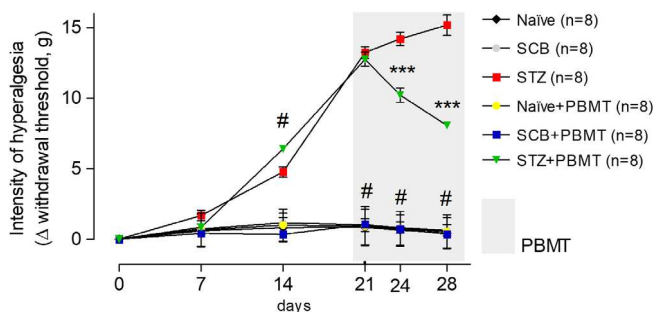


FIGURE 2 PBMT-induced anti-hyperalgesia. As observed at the green symbols (STZ + PBMT group), at the 24th and the 28th days after starting the STZ or vehicle injections, there was a significant reduction in the intensity of hyperalgesia promoted by PBMT, when compared to STZ group (hyperalgesic non-treated rats) ($P < .001$; two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test). The symbol (#) means significant difference ($P < .001$) between STZ groups (STZ and STZ + PBMT) and control groups (Naïve; Naïve + PBMT; SCB; SCB + PBMT); the symbol (***) means significant difference ($P < .001$) between STZ + PBMT and STZ group. Data are expressed as mean $\pm$ SEM; n = number of rats per group; Δ = delta; g = grams; PBMT, photobiomodulation therapy; SCB, sodium citrate buffer; STZ, streptozotocin

out and because there is a rapid degradation during the post-mortem interval at autopsy [51]. Therefore, it is difficult to obtain DRG for diagnosis and treatment of the biochemical alterations linked to diabetic neuropathy, for example. Thus, we must apply cutting-edge techniques, such as Raman spectroscopy, to investigate the disease mechanisms and the effects of the treatment. Raman spectroscopy therefore provides an innovative, noninvasive and potentially very important technique for amelioration of the diagnosis and follow-up of diabetic neuropathy, which is a growing problem worldwide. First, we tried to find specific Raman spectra of DRG tissue removed from Naïve rats. As shown in Figure 3 (Panel A), we identified six prominent peaks (2704, 2850, 2885, 2940, 3061 and 3160 cm⁻¹) which appear to be characteristic of DRG tissue. After that, we chose a peak that was considered as the “endogenous control.” From the observed peaks, 2940 cm⁻¹ showed a regular intensity between the groups, when normalized by the 2940 cm⁻¹ intensity of the Naïve group, as shown in Figure 3 (Panel B). Raman assignments (spectral biochemical interpretations) are shown in Table 3.

Only a few studies have used Raman spectroscopy to characterize central or peripheral nervous tissues. A spectral region between 2800 and 3000 cm⁻¹ (CH vibrational bands) was observed in the brain, as reported by Mizuno et al [45], at 2852, 2885 and 2938 cm⁻¹, which technically are the same peaks that we identified in DRG related to CH₂/CH₃ symmetric and asymmetric vibrations [61–63]. The peak at 2938 cm⁻¹ also showed a high intensity in all brain tissue specimens and the same occurred for 2852 and 2885 cm⁻¹, which showed high Raman intensities in the white matter and myelin fractions, respectively. Morisaki et al [67] also observed a strong peak at 2940 cm⁻¹ when they analyzed the Raman spectra of intact sciatic nerve and cultured DRG neurites, reflecting the protein content of the peripheral nervous tissue. In that study, the authors observed an increased band intense ratio (i2940 cm⁻¹/i2853 cm⁻¹) until 21 days after nerve crush injury, suggesting volume changes in proteins and lipids from axonal and Schwann cell damage and breakdown products of compact myelin.

3.4 | Spectral alterations caused by STZ-induced diabetic neuropathy were counteracted by PBMT

After we obtained the spectra from Naïve ganglia, and identified peaks that could be considered characteristic of DRG, we performed the analysis of the same observed peaks for all experimental groups (SCB; STZ; Naïve + PBMT; SCB + PBMT; STZ + PBMT). As shown in Figure 4 (Panels A–E), with the exception of 3061 cm⁻¹, all other peaks showed a significant increase of intensity (a.u.) in the STZ group

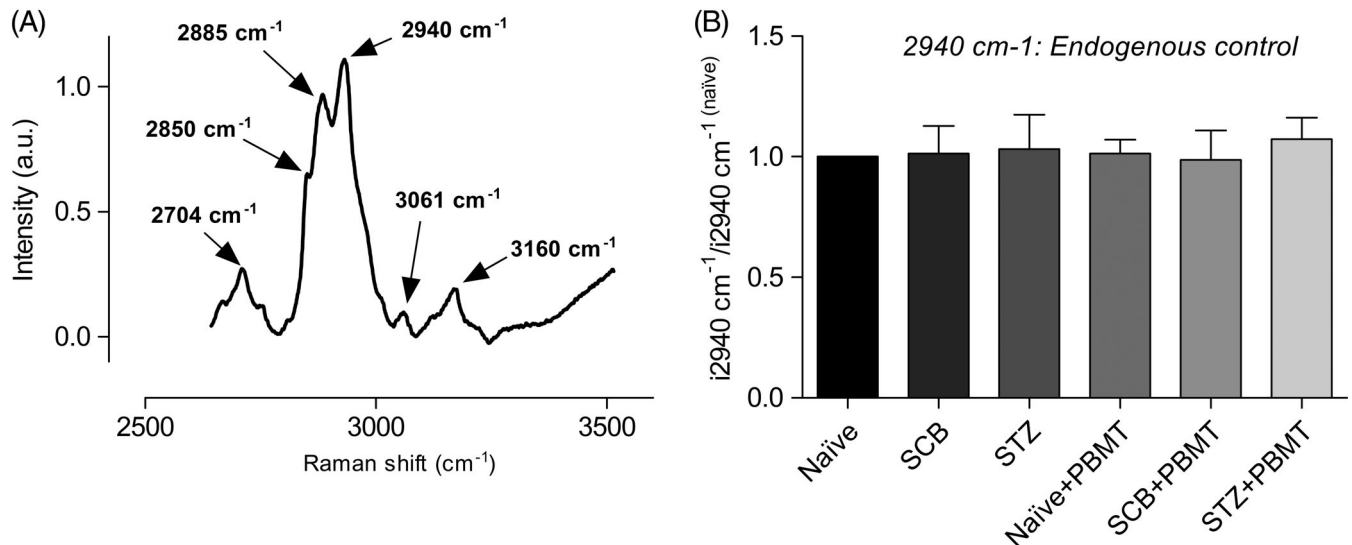


FIGURE 3 Raman spectroscopy characterization of dorsal root ganglia (DRG). Panel A: It was observed six most prominent peaks related to DRG tissue: 2704, 2850, 2885, 2940, 3061, 3160 cm^{-1} (black arrows). Panel B: After correcting the spectra baseline, the peak of 2940 cm^{-1} showed a stable intensity, with little variation (no significant difference) between the experimental groups. Normalizations were done by the $i_{2940 \text{ cm}^{-1}}$ from Naïve group. One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Data are expressed as mean $\pm$ SEM; a.u. = arbitrary units; i = intensity

TABLE 3 Raman assignments

Peak (cm^{-1})	Assignment
2704	C—H stretches [59]; stretching vibrations of CH, NH and OH groups [60]
2850	CH_2 and CH_3 symmetric stretches of lipids; fatty acids [61, 62]
2885	CH_3 ; lipids; fatty acids [61]
2940	CH_2 asymmetric stretch; C—H vibrations in lipids and proteins; fatty acids [61–63]
3061	CH stretching; lipids; fatty acids [61, 64]
3160	CH stretching; O—H and N—H stretching vibrations [64, 65]

Bands attribution are shown according to the review reported by Movasaghi et al [66], regarding the Raman spectroscopy applied to natural tissues and cell biology.

compared to control groups and STZ + PBMT. For 2850 cm^{-1} , we observed a significant difference ($P < .05$) between STZ and all other groups, including STZ + PBMT (unpaired t test). For 2885 cm^{-1} , there were significant differences between STZ and SCB ($P < .05$), STZ and Naïve ($P < .01$), STZ and Naïve + PBMT ($P < .01$), STZ and STZ + PBMT ($P < .01$), and STZ vs SCB + PBMT ($P < .001$) (one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test). All the comparisons between the experimental groups are shown in Table 4.

For the peak at 2704 cm^{-1} , there were significant differences between Naïve and STZ ($P < .05$) and SCB vs STZ

($P < .05$). In addition, we observed significant differences between STZ and Naïve + PBMT ($P < .01$), STZ and SCB + PBMT ($P < .01$), and STZ and STZ + PBMT ($P < .01$). At 3160 cm^{-1} , significant differences were observed between STZ vs all the other groups, as Naïve ($P < .05$), SCB ($P < .05$), Naïve + PBMT ($P < .001$), SCB + PBMT ($P < .001$) and STZ + PBMT ($P < .001$) (one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test) (see Table 4).

In general, PBMT was able to keep the peak intensities of the STZ + PBMT group at levels very close to control groups, as there were no differences between STZ + PBMT and the control groups (Naïve, SCB, Naïve + PBMT and SCB + PBMT) (one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test). The graphs of Raman intensity and the spectrum region to which each peak belongs are plotted in Figure 4 (Panels A-E and F, respectively). In addition, from the PCA, the principal components (PCs) vectors resembled Raman spectra, with negative (valley shape) and positive bands, as shown in Figure 5 (Panels A and B). We performed the PCA with the intensities of Raman normalized-spectra (target spectrum/ $i_{2940 \text{ cm}^{-1}}$) from 2643.38 to 3478.55 cm^{-1} . The first two PCs (PC1 and PC2) were responsible for 87.3% of all spectral variations. PC1 showed positive intensity bands (Figure 5, Panel B), corresponding to 67.0% of all spectra, with peaks at the same positions as the DRG characteristic spectra (see Figure 3, Panel A). It means that the loading plot of PC1 plus PC2 predominantly had the spectral features of the DRG Raman spectra.

Figure 6 (Panels A and B) shows the PCs score plots. PC1 and PC2 were used to separate the data between the

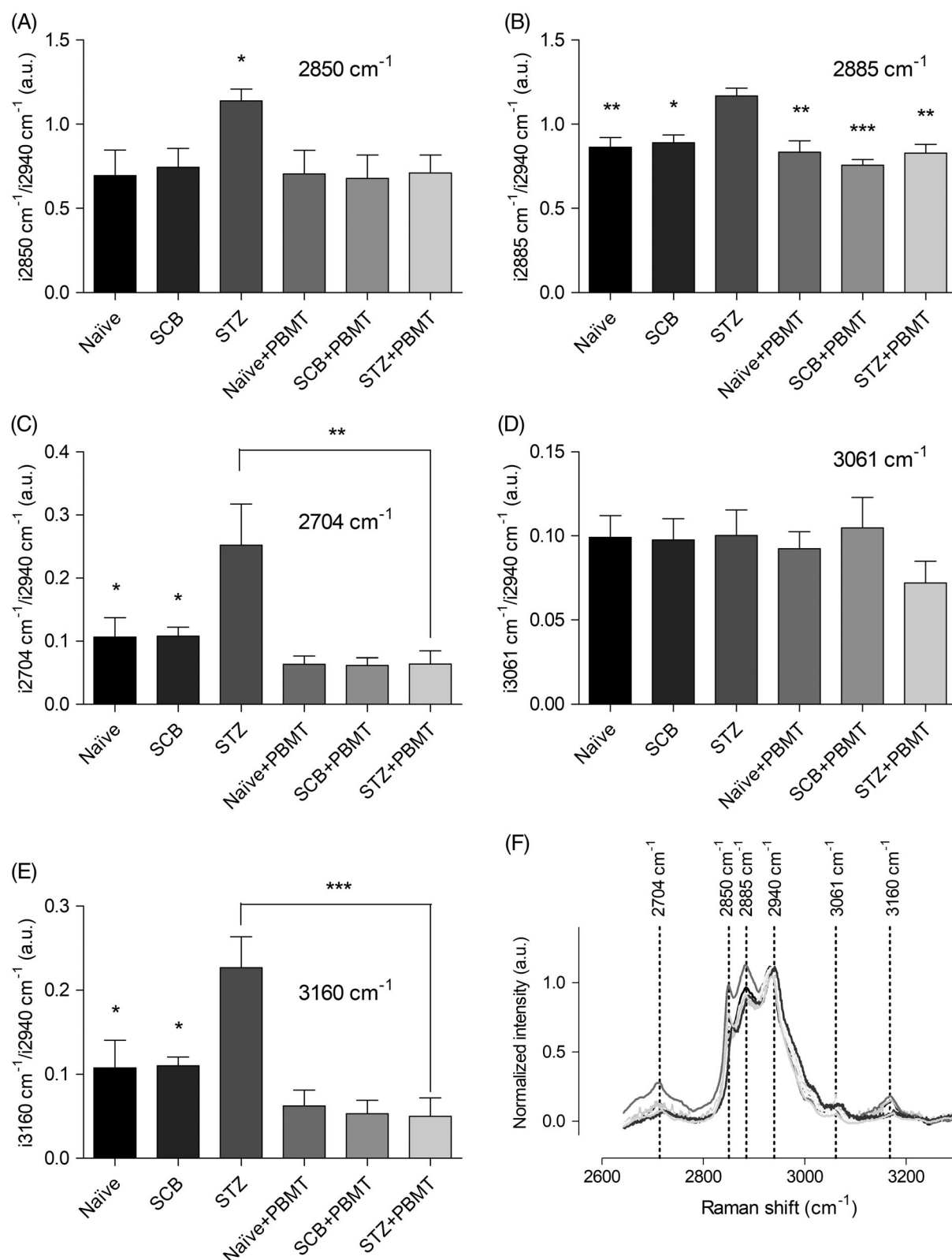


FIGURE 4 Raman normalized intensities for the peaks considered characteristics of DRG. Panels A-E: Normalized intensities for the peaks at 2704, 2850, 2885, 2940, 3061 and 3160 cm⁻¹. All increased intensities were observed in the STZ group (diabetic hyperalgesic, without PBMT), except for 3061 cm⁻¹. STZ + PBMT group was significant different from STZ group for all peaks (except for 3061 cm⁻¹); no difference between STZ + PBMT group and control groups were observed. Panel F: spectra from 2704 to 3160 cm⁻¹, for Naïve (black line), SCB (gray line), STZ (red line), Naïve + PBMT (yellow line), SCB + PBMT (blue line) and STZ + PBMT (green line) groups. The symbols (*), (**) and (***) represent the degree of significant difference ($P < .05$; $P < .01$; $P < .001$, respectively) in comparison to STZ group. One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Data are expressed as mean $\pm$ SEM; a.u. = arbitrary units; i = intensity; DRG, dorsal root ganglia; PBMT, photobiomodulation therapy; SCB, sodium citrate buffer; STZ, streptozotocin

TABLE 4 Comparisons between the experimental groups regarding the Raman average intensity

Compared groups	2704 cm ⁻¹	2850 cm ⁻¹	2885 cm ⁻¹	3061 cm ⁻¹	3160 cm ⁻¹
Naïve × SCB	0.11 ± 0.05 × 0.11 ± 0.03	0.70 ± 0.33 × 0.74 ± 0.22	0.86 ± 0.10 × 0.91 ± 0.09	0.10 ± 0.03 × 0.10 ± 0.03	0.09 ± 0.07 × 0.11 ± 0.02
Naïve × STZ	0.11 ± 0.05 × 0.25 ± 0.13*	0.70 ± 0.33 × 1.10 ± 0.12*	0.86 ± 0.10 × 1.18 ± 0.09**	0.10 ± 0.03 × 0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.07 × 0.21 ± 0.07*
Naïve × Naïve + PBMT	0.11 ± 0.05 × 0.06 ± 0.02	0.70 ± 0.33 × 0.68 ± 0.26	0.86 ± 0.10 × 0.83 ± 0.09	0.10 ± 0.03 × 0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.07 × 0.06 ± 0.04
Naïve × SCB + PBMT	0.11 ± 0.05 × 0.06 ± 0.02	0.70 ± 0.33 × 0.70 ± 0.33	0.86 ± 0.10 × 0.76 ± 0.06	0.10 ± 0.03 × 0.10 ± 0.04	0.09 ± 0.07 × 0.05 ± 0.04
Naïve × STZ + PBMT	0.11 ± 0.05 × 0.06 ± 0.04	0.70 ± 0.33 × 0.71 ± 0.24	0.86 ± 0.10 × 0.83 ± 0.11	0.10 ± 0.03 × 0.07 ± 0.03	0.09 ± 0.07 × 0.05 ± 0.04
SCB × STZ	0.11 ± 0.03 × 0.25 ± 0.13*	0.74 ± 0.22 × 1.10 ± 0.12*	0.91 ± 0.09 × 1.18 ± 0.09*	0.10 ± 0.03 × 0.09 ± 0.03	0.11 ± 0.02 × 0.21 ± 0.07**
SCB × Naïve + PBMT	0.11 ± 0.03 × 0.06 ± 0.02	0.74 ± 0.22 × 0.68 ± 0.26	0.91 ± 0.09 × 0.83 ± 0.09	0.10 ± 0.03 × 0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.02 × 0.06 ± 0.04
SCB × SCB + PBMT	0.11 ± 0.03 × 0.06 ± 0.02	0.74 ± 0.22 × 0.70 ± 0.33	0.91 ± 0.09 × 0.76 ± 0.06	0.10 ± 0.03 × 0.10 ± 0.04	0.11 ± 0.02 × 0.05 ± 0.04
SCB × STZ + PBMT	0.11 ± 0.03 × 0.06 ± 0.04	0.74 ± 0.22 × 0.71 ± 0.24	0.91 ± 0.09 × 0.83 ± 0.11	0.10 ± 0.03 × 0.07 ± 0.03	0.11 ± 0.02 × 0.05 ± 0.04
STZ × Naïve + PBMT	0.25 ± 0.13 × 0.06 ± 0.02**	1.10 ± 0.12 × 0.68 ± 0.26*	1.18 ± 0.09 × 0.83 ± 0.09**	0.09 ± 0.03 × 0.09 ± 0.02	0.21 ± 0.07 × 0.06 ± 0.04***
STZ × SCB + PBMT	0.25 ± 0.13 × 0.06 ± 0.02**	1.10 ± 0.12 × 0.70 ± 0.33*	1.18 ± 0.09 × 0.76 ± 0.06***	0.09 ± 0.03 × 0.10 ± 0.04	0.21 ± 0.07 × 0.05 ± 0.04***
STZ × STZ + PBMT	0.25 ± 0.13 × 0.06 ± 0.04**	1.10 ± 0.12 × 0.71 ± 0.24*	1.18 ± 0.09 × 0.83 ± 0.11**	0.09 ± 0.03 × 0.07 ± 0.03	0.21 ± 0.07 × 0.05 ± 0.04***
Naïve + PBMT × SCB + PBMT	0.06 ± 0.02 × 0.06 ± 0.02	0.68 ± 0.26 × 0.70 ± 0.33	0.83 ± 0.09 × 0.76 ± 0.06	0.09 ± 0.02 × 0.10 ± 0.04	0.06 ± 0.04 × 0.05 ± 0.04

Symbols (*); (**); (***) mean significant difference ($P < .05$; $P < .01$; $P < .001$, respectively); × = “versus”; each mean value corresponds to normalized intensities of 24 spectra per group (three per ganglion; eight ganglia per group); peaks intensities were normalized by 2940 cm⁻¹ intensity (i2940 cm⁻¹). One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Data are expressed as mean ± SD.

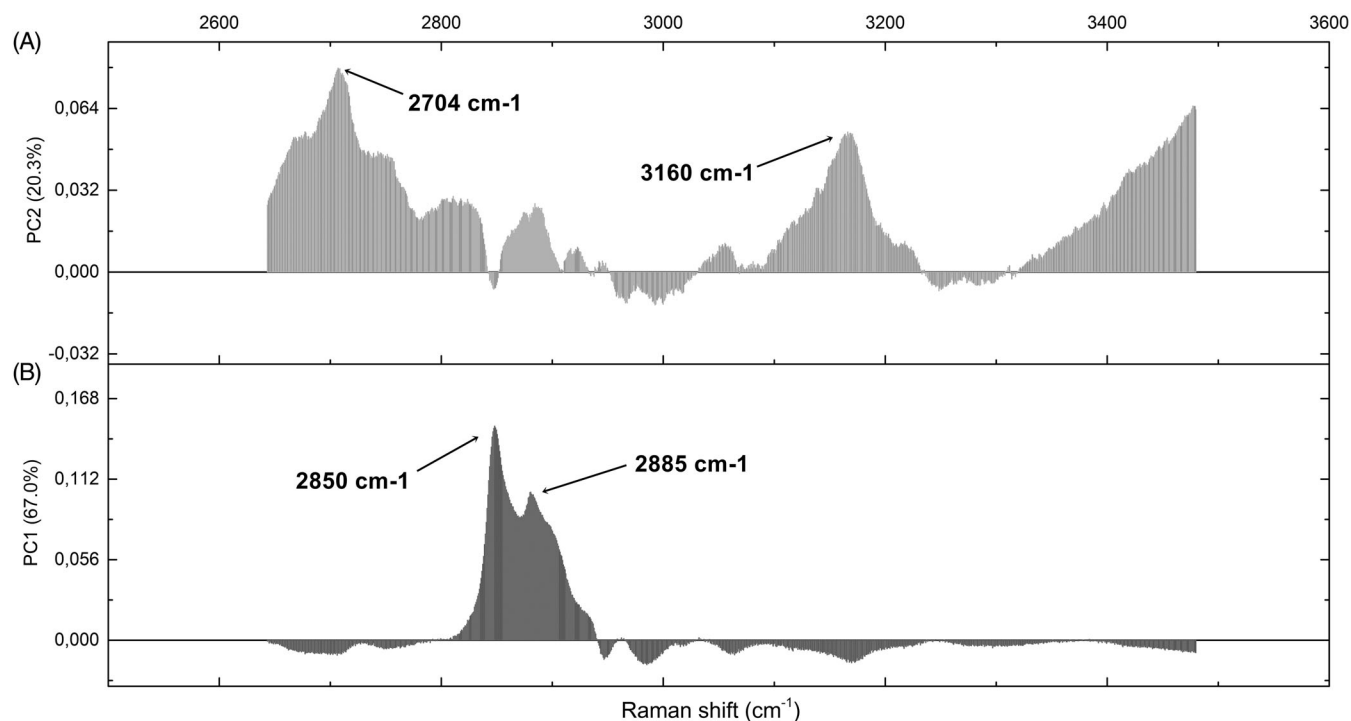


FIGURE 5 Loading plot from principal component analysis (PCA). Panel A: Principal component 2 (PC2) represents 20.3% of the dorsal root ganglia (DRG) Raman spectra, especially composed of the peaks at 2704 and 3160 cm^{-1} (black arrows). Panel B: Principal component 1 (PC1) represents 67.0% of the DRG Raman spectra, composed of the peaks at 2850 and 2885 cm^{-1} (black arrows). PCA analysis was performed considering 24 spectra per group, collected (in technical triplicates) from eight DRGs. All the PCs represent the DRG Raman spectra from 2643.38 to 3478.55 cm^{-1}

experimental groups, according to the information found in each PC. An additional PC (PC3; 6.6%) was added to allow the construction of a 3D graph (Figure 6, Panel B). All control groups and STZ + PBMT occupied close positions in their PCs, especially with respect to PC1. The PC2 better represents the STZ group rather than PC1. However, by PCA exploratory analysis only, it was not possible to see a clear separation between the groups. Thus, in order to classify the groups, we implemented an LDA.

The first application of LDA reduced the spectral dimensionality in two components (LDA component 1; LDA component 2), with a classification score of 99%, as shown in Figure 7 (Panel A). Nonetheless, we observed an overlapping between the groups, that is, some points from a specific group appeared in the classification area of another group. For example, some points of the STZ group have been seen into the area of the Naïve group (see Figure 7, Panel A). On this basis, we performed an additional LDA classification analysis (LDA-LDA), which allows identifying displaced points by comparing the second classification to the original group (see points marked as “x,” Figure 7, Panel B). The classification score of the LDA-LDA analysis was 86% and shows that we can discriminate between groups by looking at their Raman spectra. This result also reinforces the positive effect of PBMT over the DRG

spectral alterations caused by diabetic neuropathy (especially the increased CH_2/CH_3 stretch vibrations; see Table 3 for Raman assignments).

Raman spectra from human brain lipids were studied by Krafft et al [60] in which peaks in the region between 2700 and 3500 cm^{-1} were observed. The peak at 2850 cm^{-1} was seen and attributed to CH_2 symmetric stretch. Likewise, the same regions that we observed were identified, such as 2886 cm^{-1} , attributed to Fermi resonance CH_2 stretch, and a CH_3 symmetric stretch band near 2935 cm^{-1} . Other peaks were observed in this range, corresponding to unsaturated $=\text{CH}$ stretch, cholesterol, cholesterol ester, and OH stretch vibrations related to ganglioside and sulfatide [68]. According to Krafft et al [60], acyl chains dominate in this spectra region, like triacylglyceride and saturated fatty acids gave different signatures, attributed to sphingomyelin, galactocerebroside and sulfatide. Interestingly, those lipids are the main component of myelin, which is produced by Schwann cells, intimately related to peripheral axons that emerge from L4/L5 DRG and transmit nociceptive information [69].

In rodent models of STZ-induced diabetic neuropathy, the loss of myelinated nerve fibers is a very common reported alteration, and the demyelination, with myelin splitting and ballooning, appears to occur in the DRG [70].

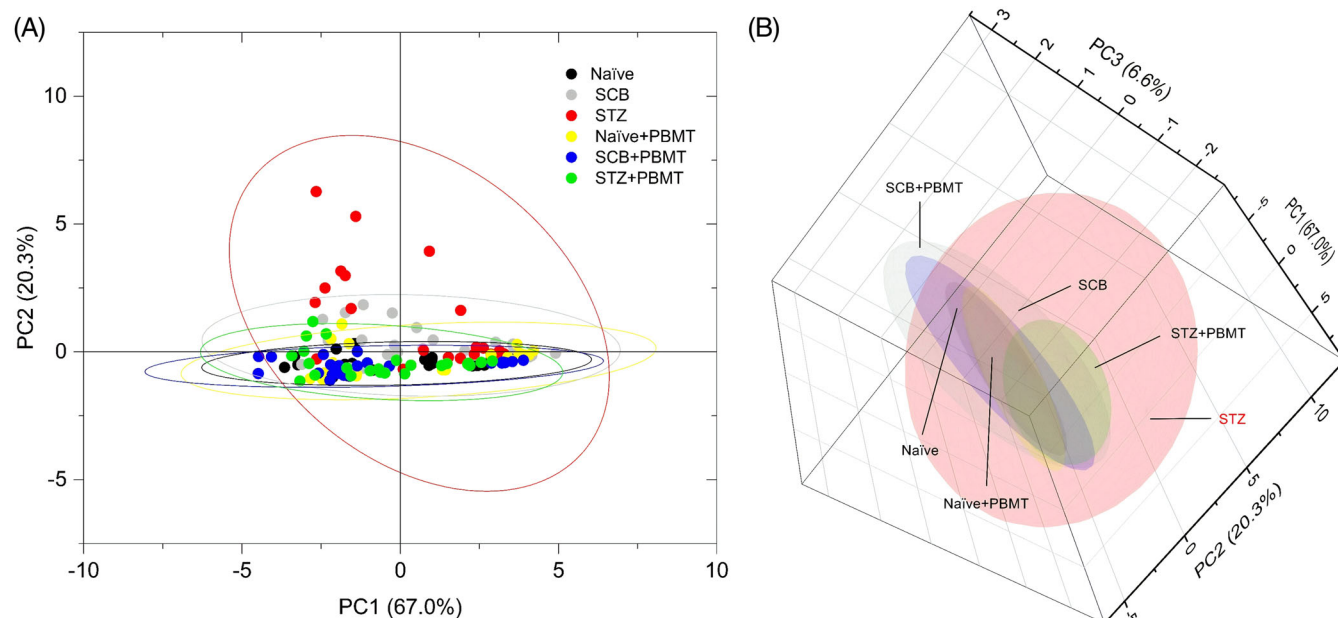


FIGURE 6 Principal component analysis (PCA) score plots. Panel A: 2D graph plotted from the PC1 (67.0%; axis X) and PC2 (20.3%; axis Y). Individual dots are distributed between four squares with the groups Naïve (black dots), SCB (gray dots), Naïve + PBMT (yellow dots), SCB + PBMT (blue dots) and STZ + PBMT (green dots) highly located in the central part, which means that the spectra from those groups better represents the “healthy” DRG spectra. Red dots (STZ group) are scattered and probably correlate with the alterations caused by the diabetic neuropathic hyperalgesia. Panel B: 3D graph considering a third PC (PC3, 6.6%); ellipsoids show the limits between the groups, with an additional axis (Z); connectors are indicating the group of reference; PCA analysis was performed considering 24 spectra per group, collected (in technical triplicates) from eight DRGs per group. All the PCs represent the DRG Raman spectra from 2643.38 to 3478.55 cm^{-1} . DRG, dorsal root ganglia; PBMT, photobiomodulation therapy; SCB, sodium citrate buffer; STZ, streptozotocin

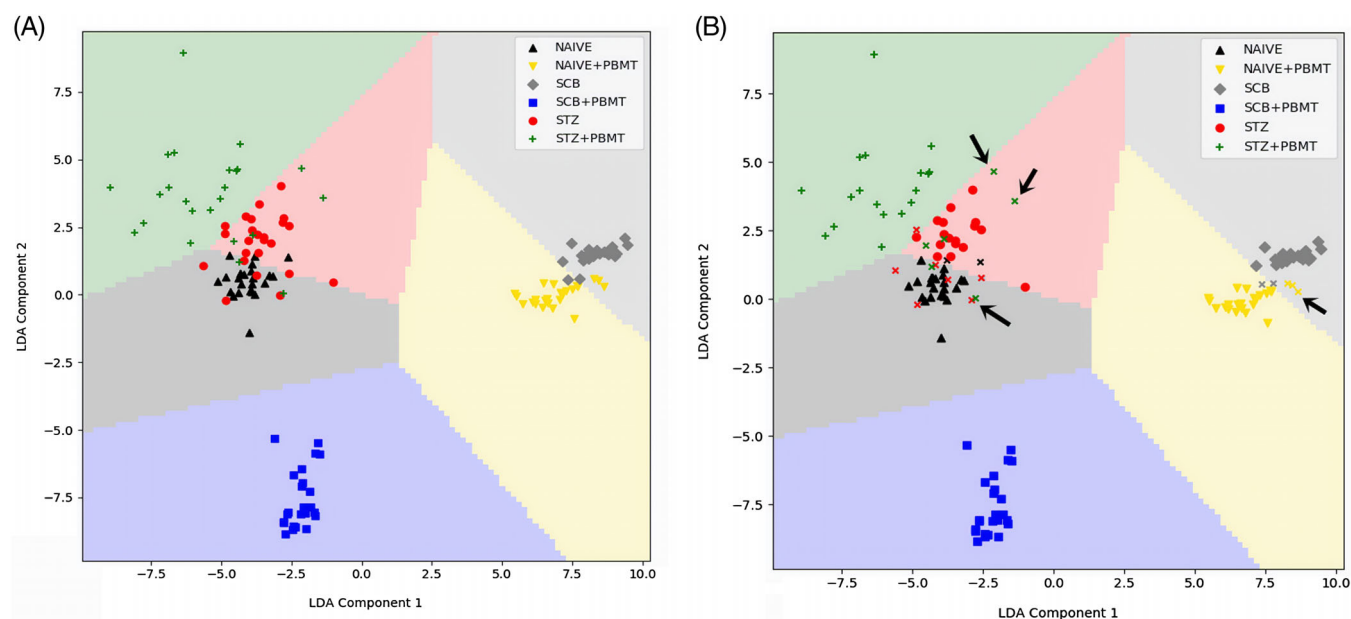


FIGURE 7 Linear discriminant analysis (LDA) score plots. Panel A: 2D LDA graph plotted from the LDA component 1 (axis X) and LDA component 2 (axis Y). Individual symbols are distributed between their respective areas: Naïve (black symbols), SCB (gray symbols), STZ (red symbols), Naïve + PBMT (yellow symbols), SCB + PBMT (blue symbols) and STZ + PBMT (green symbols). Several points, especially for STZ group, are out of their respective areas. Panel B: 2D LDA-LDA graph showing symbols now marked as “x” (black arrows), which means that those points (previously classified into wrong groups) were excluded, improving the classification and distinctiveness between groups based on valid points. LDA-LDA classification score was 86%. LDA analyses were performed considering 24 spectra per group, collected (in technical triplicates) from eight DRGs. All the LDA components represent the DRG Raman spectra from 2643.38 to 3478.55 cm^{-1} . DRG, dorsal root ganglia; PBMT, photobiomodulation therapy; SCB, sodium citrate buffer; STZ, streptozotocin

Splitting implicates defects of myelin adhesive molecules, such as P0, during the expansion of extracellular space and intramyelinic-accumulated edema [71]. These events are followed by increased protein transcripts, and may suggest an early, but failed, attempt to repair [72]. The excessive production of myelin and proteins explains the high intensity Raman spectra observed in the STZ group. Conversely, the treatment with PBMT may counteract the “pro-inflammatory” condition at the DRG, resulting in levels of inflammatory agents closer to control with adequate remyelination. In this sense, the anti-hyperalgesic effect promoted by PBMT corroborates with the normal Raman spectra intensity at the regions of CH₂/CH₃ stretch vibrations.

4 | CONCLUSIONS

The results of this study indicate that Raman spectroscopy may well be a promising and important tool to monitor biochemical changes in the DRG of STZ-induced diabetic neuropathic rats, likewise the beneficial effects of PBMT over hyperalgesia and altered Raman spectra linked to experimental diabetic neuropathy. Our results could be helpful for the discussion of further research investigations in the fields of photobiomodulation and vibrational spectroscopy applied to the peripheral nervous system and diabetic neuropathy.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed by São Paulo Research Foundation (FAPESP) (Grants #2014/25153-7, #2015/12673-5, #2018/05108-8) and by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). We thank to the National Institute of Science and Photonics Technology Applied to Cellular Biology (INFABIC) and LAMULT for technical assistance with Raman devices and spectra collection.

ORCID

Willians F. Vieira  <https://orcid.org/0000-0003-3022-7997>

Carlos A. Parada  <https://orcid.org/0000-0001-5209-8853>

REFERENCES

- [1] A. A. Robert, A. Al-Dawish, M. Mujammami, M. Abdulaziz, A. Dawish, *Int. J. Pediatr.* **2018**, 2018, 1. <https://doi.org/10.1155/2018/9408370>.
- [2] B. C. Callaghan, H. Cheng, C. L. Stables, A. L. Smith, E. L. Feldman, *Lancet Neurol.* **2014**, 11, 521. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70065-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70065-0).
- [3] C. Cheng, D. W. Zochodne, *Diabetes* **2003**, 52, 2363. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.9.2363>.
- [4] A. M. Schmeichel, J. D. Schmelzer, P. A. Low, *Diabetes* **2003**, 52, 165. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.1.165>.
- [5] A. M. Vincent, *FASEB J.* **2005**, 24, 1. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2513fje>.
- [6] A. M. Vincent, B. C. Callaghan, A. L. Smith, E. L. Feldman, *Nat. Rev. Neurol.* **2011**, 7, 573. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.137>.
- [7] P. J. Armati, E. K. Mathey, *J. Peripher. Nerv. Syst.* **2014**, 23, 14. <https://doi.org/10.1111/jns5.12057>.
- [8] S. Yagihashi, H. Mizukami, K. Sugimoto, *J. Diabetes Investig.* **2011**, 2, 18. <https://doi.org/10.1111/j.2040-1124.2010.00070.x>.
- [9] A. M. Vincent, J. W. Russell, P. Low, E. L. Feldman, *Endocr. Rev.* **2004**, 25, 612. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0019>.
- [10] I. G. Obrosova, *Antioxid. Redox Signal.* **2005**, 7(c), 1543. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1543>.
- [11] K. Sugimoto, M. Yasujima, S. Yagihashi, *Curr. Pharm. Des.* **2008**, 14, 953. <https://doi.org/10.2174/138161208784139774>.
- [12] M. P. Lunn, R. A. Hughes, P. J. Wiffen, *Cochrane Database Syst. Rev.* **2009**, 4, CD007115. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007115.pub2>.
- [13] P. J. Wiffen, S. Collins, H. J. McQuay, D. Carroll, A. Jadad, R. A. Moore, *Cochrane Database Syst. Rev.* **2005**, 3, CD001133. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001133.pub2>.
- [14] T. Saarto, P. Wiffen, *Cochrane Database Syst. Rev.* **2007**, 4, CD005454. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005454.pub2>.
- [15] R. I. Barbosa, E. K. Da Silva Rodrigues, G. Tamanini, A. M. Marcolino, V. M. C. Elui, R. R. De Jesus Guirro, N. Mazzer, M. C. R. Fonseca, *BMC Musculoskelet. Disord.* **2012**, 13, 248. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-13-248>.
- [16] R. T. Chow, P. J. Armati, *Photomed. Laser Surg.* **2016**, 34, 599. <https://doi.org/10.1089/pho.2015.4048>.
- [17] R. T. Chow, M. I. Johnson, R. A. Lopes-Martins, J. M. Bjordal, *Lancet* **2009**, 374, 1897. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61522-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61522-1).
- [18] V. M. Holanda, M. C. Chavantes, X. Wu, J. J. Anders, *Lasers Surg. Med.* **2017**, 37, 1. <https://doi.org/10.1002/lsm.22628>.
- [19] K. R. Byrnes, R. W. Waynant, I. K. Ilev, X. Wu, L. Barna, K. Smith, R. Heckert, H. Gerst, J. J. Anders, *Lasers Surg. Med.* **2005**, 36, 171. <https://doi.org/10.1002/lsm.20143>.
- [20] C. C. Alcântara, D. Gigo-Benato, T. F. Salvini, A. L. R. Oliveira, J. J. Anders, T. L. Russo, *Lasers Surg. Med.* **2013**, 45, 246. <https://doi.org/10.1002/lsm.22129>.
- [21] K. P. S. Fernandes, A. N. Alves, F. D. Nunes, N. H. C. Souza, J. A. Silva, S. K. Bussadori, R. A. Ferrari, *Lasers Med. Sci.* **2013**, 28, 1043. <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1233-x>.
- [22] D. Dourado, R. Matias, M. Barbosa-Ferreira, B. A. K. da Silva, J. I. M. de Araújo, W. F. Vieira, M. A. da Cruz-Höfling, *Lasers Med. Sci.* **2017**, 32, 1357. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2252-4>.
- [23] W. F. Vieira, B. Kenzo-Kagawa, J. C. Cogo, V. Baranauskas, M. A. Da Cruz-Höfling, *PLoS One* **2016**, 11, 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158980>.
- [24] W. F. Vieira, B. Kenzo-Kagawa, M. H. M. Britto, H. J. Ceragioli, K. K. Sakane, V. Baranauskas, M. A. da Cruz-Höfling, *Lasers Med. Sci.* **2018**, 33, 503. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2389-1>.
- [25] S. Passarella, T. Karu, *J. Photochem. Photobiol. B* **2014**, 140, 344. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.07.021>.

- [26] T. Karu, *Photomed. Laser Surg.* **2013**, *31*, 189. <https://doi.org/10.1089/pho.2013.3510>.
- [27] C. H. Camp, M. T. Cicerone, *Nat. Photonics* **2015**, *9*, 295. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2015.60>.
- [28] I. Pence, A. Mahadevan-Jansen, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 1958. <https://doi.org/10.1039/c5cs00581g>.
- [29] S. Cui, S. Zhang, S. Yue, *J. Healthc. Eng.* **2018**, *2018*, 1. <https://doi.org/10.1155/2018/8619342>.
- [30] R. Shaikh, T. K. Dora, S. Chopra, A. Maheshwari, K. D. Kedar, R. Bharat, C. M. Krishna, *J. Biomed. Opt.* **2014**, *19*, 087001. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.8.087001>.
- [31] C. M. O'Brien, E. Vargis, B. C. Paria, K. A. Bennett, A. Mahadevan-Jansen, J. Reese, *Acta Paediatr. Int. J. Paediatr.* **2014**, *103*, 715. <https://doi.org/10.1111/apa.12630>.
- [32] I. R. M. Ramos, A. Malkin, F. M. Lyng, *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 1. <https://doi.org/10.1155/2015/561242>.
- [33] L. Lim, B. Nichols, M. R. Migden, N. Rajaram, J. S. Reichenberg, M. K. Markey, M. I. Ross, J. W. Tunnell, *J. Biomed. Opt.* **2014**, *19*, 117003. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.11.117003>.
- [34] J. Schleusener, P. Gluszczyńska, C. Reble, I. Gersonde, J. Helfmann, J. W. Fluhr, J. Lademann, J. Röwert-Hubert, A. Patzelt, M. C. Meinke, *Exp. Dermatol.* **2015**, *24*, 767. <https://doi.org/10.1111/exd.12768>.
- [35] V. P. Zakharov, I. A. Bratchenko, D. N. Artemyev, O. O. Myakinin, D. V. Kornilin, S. V. Kozlov, A. A. Moryatov, *J. Biomed. Opt.* **2015**, *20*, 25003. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.2.025003>.
- [36] H. Krishna, S. K. Majumder, P. Chaturvedi, M. Sidramesh, P. K. Gupta, *J. Biophotonics* **2014**, *7*, 690. <https://doi.org/10.1002/jbio.201300030>.
- [37] M. S. Bergholt, W. Zheng, K. Y. Ho, M. Teh, K. G. Yeoh, J. B. Yan So, A. Shabbir, Z. Huang, *Gastroenterology* **2014**, *146*, 27. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.002>.
- [38] J. Wang, K. Lin, W. Zheng, K. Y. Ho, M. Teh, K. G. Yeoh, Z. Huang, *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 8303. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8727-x>.
- [39] M. S. Bergholt, W. Zheng, K. Lin, J. Wang, H. Xu, J. L. Ren, K. Y. Ho, M. Teh, K. G. Yeoh, Z. Huang, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 960. <https://doi.org/10.1021/ac503287u>.
- [40] J. Desroches, M. Jermyn, K. Mok, C. Lemieux-Leduc, J. Mercier, K. St-Arnaud, K. Urme, M. C. Guidot, E. Marple, K. Petrecca, F. Leblond, *Biomed. Opt. Express* **2015**, *6*, 2380. <https://doi.org/10.1364/BOE.6.002380>.
- [41] M. Jermyn, K. Mok, J. Mercier, J. Desroches, J. Pichette, K. Saint-Arnaud, L. Bernstein, M. C. Guiot, K. Petrecca, F. Lebond, *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 1. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa2384>.
- [42] S. Li, L. Li, Q. Zeng, Y. Zhang, Z. Guo, Z. Liu, M. Jin, C. Su, L. Lin, J. Xu, S. Liu, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1. <https://doi.org/10.1038/srep09582>.
- [43] Y. Shi, D. Zhang, T. B. Huff, X. Wang, R. Shi, X. M. Xu, J. X. Cheng, *J. Biomed. Opt.* **2011**, *16*, 106012. <https://doi.org/10.1117/1.3641988>.
- [44] T. Minamikawa, Y. Harada, T. Takamatsu, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1. <https://doi.org/10.1038/srep17165>.
- [45] A. Mizuno, T. Hayashi, K. Tashibu, S. Maraishi, K. Kawauchi, Y. Ozaki, *Neurosci. Lett.* **1992**, *141*, 47. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90331-Z](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90331-Z).
- [46] T. B. Huff, J.-X. Cheng, *J. Microsc.* **2007**, *225*, 175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2007.01729.x>.
- [47] E. E. Verdiyev, E. S. Allakhverdiev, G. V. Maksimov, *PLoS One* **2016**, *11*, e0158083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158083>.
- [48] N. N. Rodionova, E. S. Allakhverdiev, G. V. Maksimov, *PLoS One* **2017**, *12*, e0185170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185170>.
- [49] World Association for Laser Therapy (WALT), WALT recommended treatment doses x LLLT. **2010**. http://waltza.co.za/wp-content/uploads/2012/08/Dose_table_904nm_for_Low_Level_Laser_Therapy_WALT-2010.pdf (accessed: January 2019).
- [50] P. H. C. Eilers, H. F. M. Boelens, Baseline correction with asymmetric least squares smoothing. **2005**, 1. https://zanran_storage.s3.amazonaws.com/www.science.uva.nl/ContentPages/443199618.pdf (accessed: September 2018).
- [51] M. Kobayashi, D. W. Zochodne, *J. Diabetes Investig.* **2018**, *9*, 1239. <https://doi.org/10.1111/jdi.12833>.
- [52] D. W. Zochodne, N. Ramji, C. Toth, *Neuroscientist* **2008**, *14*, 311. <https://doi.org/10.1177/1073858408316175>.
- [53] X. Zhou, R. A. Rush, E. M. McLachlan, *J. Neurosci.* **1996**, *76*, 2901. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-09-02901.1996>.
- [54] P. Hu, E. M. McLachlan, *Neuroscience* **2002**, *112*, 23. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00065-9).
- [55] P. Hu, A. L. Bembrick, K. A. Keay, E. M. McLachlan, *Brain Behav. Immun.* **2007**, *21*, 599. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.10.013>.
- [56] A. L. M. de Andrade, P. S. Bossini, A. L. M. do Canto De Souza, A. D. Sanchez, N. A. Parizotto, *Lasers Med. Sci.* **2017**, *32*, 865. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2186-x>.
- [57] F. C. Pereira, J. R. Parisi, C. B. Maglioni, G. B. Machado, P. Barragán-Iglesias, S. JRT, M. L. Silva, *Lasers Surg. Med.* **2017**, *49*, 844. <https://doi.org/10.1002/lsm.22696>.
- [58] V. R. da Silva Oliveira, D. P. Cury, L. B. Yamashita, M. V. Esteca, I. S. Watanabe, Y. F. Bergmann, E. F. Toniolo, C. S. Dale, *J. Biophotonics* **2018**, *11*, e201800110. <https://doi.org/10.1002/jbio.201800110>.
- [59] J. Conroy, A. G. Ryder, M. N. Leger, K. Hennessey, M. G. Madden, *Proc SPIE* **2005**, *5826*, 131. <https://doi.org/10.1117/12.605056>.
- [60] C. Krafft, L. Neudert, T. Simat, R. Salzer, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2005**, *61*, 1529. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.11.017>.
- [61] G. Shetty, C. Kendall, N. Shepherd, N. Stone, H. Barr, *Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus*. **2006**, *94*, 1460. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603102>.
- [62] S. Koljenovic, T. B. Schut, A. Vincent, J. M. Kros, G. J. Puppels, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7958. <https://doi.org/10.1021/ac0512599>.
- [63] S. Sigurdsson, P. A. Philipsen, L. K. Hansen, J. Larsen, S. Member, M. Gniadecka, H. C. Wulf, *I.E.E.E. Trans. Biomed. Eng.* **2004**, *51*, 1784. <https://doi.org/10.1109/TBME.2004.831538>.
- [64] K. Kachrimanis, D. E. Braun, U. J. Griesser, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43*, 407. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.07.032>.
- [65] R. Eckel, H. Huo, H. Guan, X. Hu, X. Che, *Vib. Spectrosc.* **2001**, *27*, 165. [https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(01\)00134-5](https://doi.org/10.1016/S0924-2031(01)00134-5).
- [66] Z. Movasaghi, S. Rehman, I. U. Rehman, *Appl. Spectrosc. Rev.* **2007**, *42*, 493. <https://doi.org/10.1080/05704920701551530>.

- [67] S. Morisaki, C. Ota, K. Matsuda, N. Kaku, H. Fujiwara, R. Oda, H. Ishibashi, T. Kubo, M. Kawata, *J. Biomed. Opt.* **2013**, *18*, 116011. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.18.11.116011>.
- [68] D. Borchman, D. Tang, M. C. Yappert, *Biospectroscopy* **1999**, *5*, 151. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6343\(1999\)5:3<151::AID-BSPY5>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6343(1999)5:3<151::AID-BSPY5>3.0.CO;2-D).
- [69] W. M. Campana, *Brain Behav. Immun.* **2007**, *21*, 522. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.12.008>.
- [70] A. P. Mizisin, *Handbook of Clinical Neurology* (Eds: D. W. Zochodne, R. A. Malik), 1st ed., Vol. 126, Elsevier B.V., Amsterdam, **2014**, p. 401. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53480-4.00029-1>.
- [71] A. P. Mizisin, G. D. Shelton, S. Wagner, C. Rusbridge, H. C. Powell, *Acta Neuropathol.* **1998**, *95*, 171. <https://doi.org/10.1007/s004010050783>.
- [72] R. Kawashima, H. Kojima, K. Nakamura, A. Arahata, Y. Fujita, Y. Tokuyama, T. Saito, S. Furudate, T. Kurihara, S. Yagishita, K. Kitamura, Y. Tamai, *Neurochem. Res.* **2007**, *32*, 1002. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9260-2>.

How to cite this article: Vieira WF, de Magalhães SF, Farias FH, de Thomaz AA, Parada CA. Raman spectroscopy of dorsal root ganglia from streptozotocin-induced diabetic neuropathic rats submitted to photobiomodulation therapy. *J. Biophotonics*. 2019;e201900135. <https://doi.org/10.1002/jbio.201900135>

5.13 Avaliação da dinâmica de cálcio intracelular

5.13.1 Experimento *ex vivo*: dinâmica intracelular de cálcio em neurônios dos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos submetidos à LLLT

Foi realizado ensaio da dinâmica de cálcio intracelular $\Delta[Ca^{2+}]_i$ em cultura primária de neurônios dos GRDs L4-L5, coletados a partir de ratos dos grupos SCB, STZ e STZ+LLLT, no 28º dia do protocolo experimental. O ensaio foi realizado sob estímulo com diferentes concentrações de potássio $\uparrow[K^+]_e$ [KCl 5 mM (basal), 15 mM e 50 mM], por meio de um sistema automatizado de válvulas. Foi observado pico de fluorescência, atribuído à ligação do Fluo-4, AM, ao cálcio intracelular, nos três grupos (SCB, STZ e STZ+LLLT) após estímulo com alta concentração de potássio (KCl 50 mM), conforme observado na Figura 43, Painéis C, F e I.

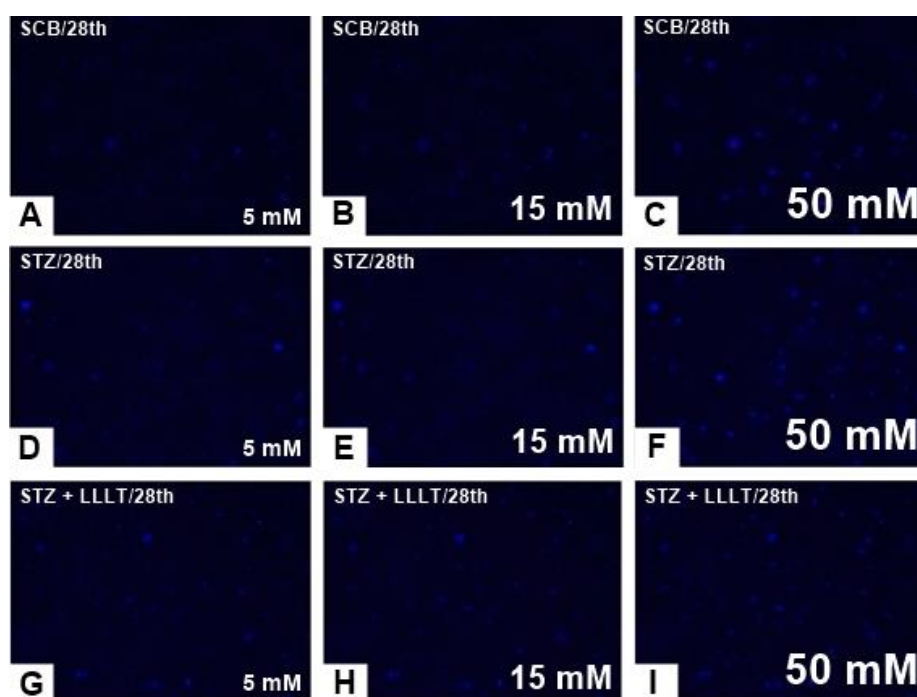


Figura 43. Imagens representativas das fluorescências durante os incrementos da concentração de KCl no meio extracelular. As placas de cultura primária de neurônios dos GRDs L4-L5 de ratos dos grupos SCB (Painéis A, B e C), STZ (Painéis D, E e F) e STZ+LLLT (Painéis G, H e I), foram incubadas com Fluo-4, AM, e receberam estímulo de KCl no meio extracelular, por meio de solução de Hank's (HBSS) em diferentes concentrações: 5 mM (Painéis A, D e G), 15 mM (Painéis B, E e H) e 50 mM (Painéis C, F e I). Foi observado aumento da intensidade de fluorescência (ΔF) relacionado ao $\Delta[Ca^{2+}]_i$, especialmente na concentração mais alta de KCl (50 mM), para os grupos SCB (Painel C) e STZ (Painel F). Aumento de 10x.

A análise estatística demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) no pico de fluorescência (KCl 50 mM) entre os grupos STZ e STZ+LLLT (Figura 44, Painéis A e B). Os neurônios provenientes dos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos tratados com LLLT (grupo STZ+LLLT), apresentaram menor responsividade (com base na intensidade de fluorescência, em unidades arbitrárias) ao estímulo com alta concentração de potássio (KCl 50 mM). Nos três grupos de células (SCB, STZ e STZ+LLLT), após o pico de fluorescência, a intensidade deste (calculado pelo $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) não retornou aos valores basais, conforme observado na Figura 44, Painel B.

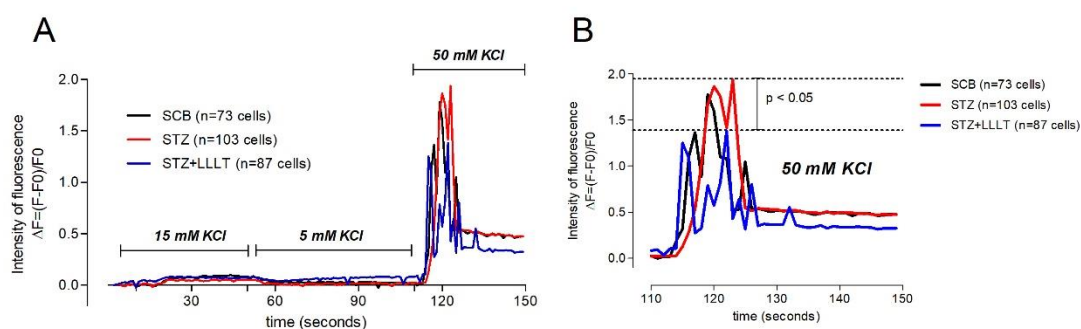


Figura 44. Dinâmica de cálcio intracelular: experimento *ex vivo*. **Painel A:** Os neurônios cultivados a partir de GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos tratados com LLLT (grupo STZ+LLLT; **linha azul**), apresentaram menor intensidade de fluorescência (ΔF), calculada pelo $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, em relação aos neurônios de animais diabéticos neuropáticos sem tratamento (grupo STZ; **linha vermelha**), durante estímulo com alta concentração de KCl (50 mM). Não foram observadas diferenças na intensidade de fluorescência (ΔF) entre os grupos de neurônios durante os estímulos com KCl 5 (basal) e 15 mM. **Painel B:** Zoom dos picos de fluorescência durante o estímulo com alta concentração de KCl (50 mM). A análise estatística foi realizada a partir dos picos de fluorescência observados durante o estímulo com alta concentração de KCl (50 mM). Após o estímulo, a intensidade de fluorescência [$\Delta F = (F-F_0) / F_0$] não retornou aos valores basais para nenhum dos grupos. *Teste-t* não-pareado. Símbolo (*) representa $p < 0,05$; n = número neurônios do GRD, por grupo. Dados expressos como a média de cada placa, para cada segundo (s).

Além da intensidade de fluorescência relacionada ao $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, foi realizado o estudo populacional dos neurônios que responderam às diferentes concentrações de KCl (exceto 5 mM, basal). Não foram observadas diferenças significativas no número de neurônios responsivos entre os diferentes grupos (SCB, STZ e STZ+LLLT), para ambas as concentrações de KCl (15 ou 50 mM), conforme observado na Figura 45, Painéis A e B. Da

mesma maneira, a porcentagem⁸ de neurônios responsivos à menor concentração de KCl (15 mM) não se alterou (Figura 45, Painel C).

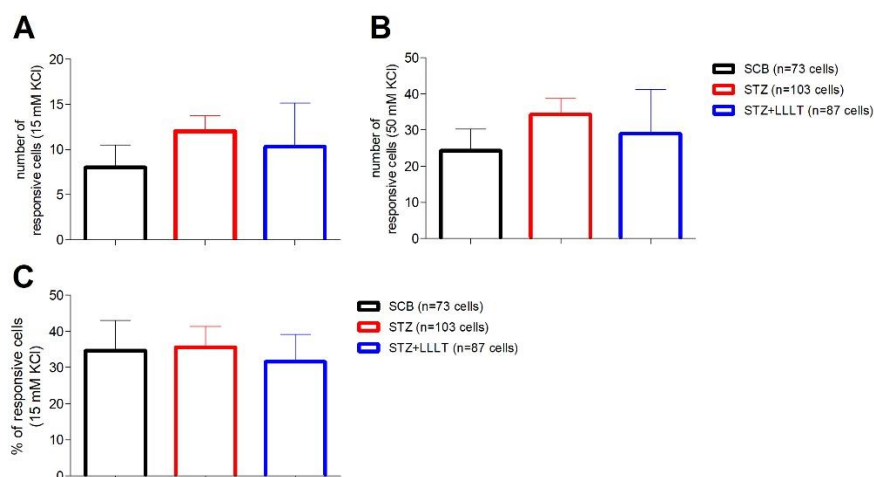


Figura 45. Dinâmica de cálcio intracelular (*ex vivo*): estudo populacional. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos SCB (barras pretas), STZ (barras vermelhas) e STZ+LLLT (barras azuis) no número de células responsivas ao estímulo com KCl 15 mM (**Painel A**) ou ao estímulo com KCl 50 mM (**Painel B**). **Painel C:** gráfico de barras mostrando a porcentagem (%) de células responsivas à menor concentração de KCl (15 mM) em relação ao total de neurônios responsivos (viáveis), que responderam ao estímulo com alta concentração de potássio (KCl 50 mM). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.13.2 Experimento *in vitro*: dinâmica de cálcio intracelular em cultura primária de neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT (*long-term response*)⁹

Foi realizado estudo da dinâmica de cálcio intracelular em cultura primária de neurônios do GRD, mantidos durante 24 h em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose) ou hiperglicêmico (55 mM de glicose) (grupos *Low-glucose* e *High-glucose*, respectivamente) e, também, de neurônios expostos à LLLT por meio da técnica de varredura (*swiping motion*) (grupos *Low-glucose+LLLT* e *High-glucose+LLLT*, respectivamente). Nas imagens representativas das culturas de neurônios do GRD (Figura 46), é possível observar aumento da intensidade de fluorescência durante o estímulo com 15 mM de KCl e, especialmente, durante o estímulo com alta concentração de potássio (50 mM de KCl).

⁸ Porcentagem (%) em relação ao número total de neurônios responsivos (viáveis), os quais assumimos serem aqueles que respondem ao estímulo com alta concentração de potássio (KCl 50 mM).

⁹ *Long-term response* refere-se às alterações da fluorescência causadas pela exposição prévia à LLLT, ou seja, as respostas não são observadas em tempo-real.

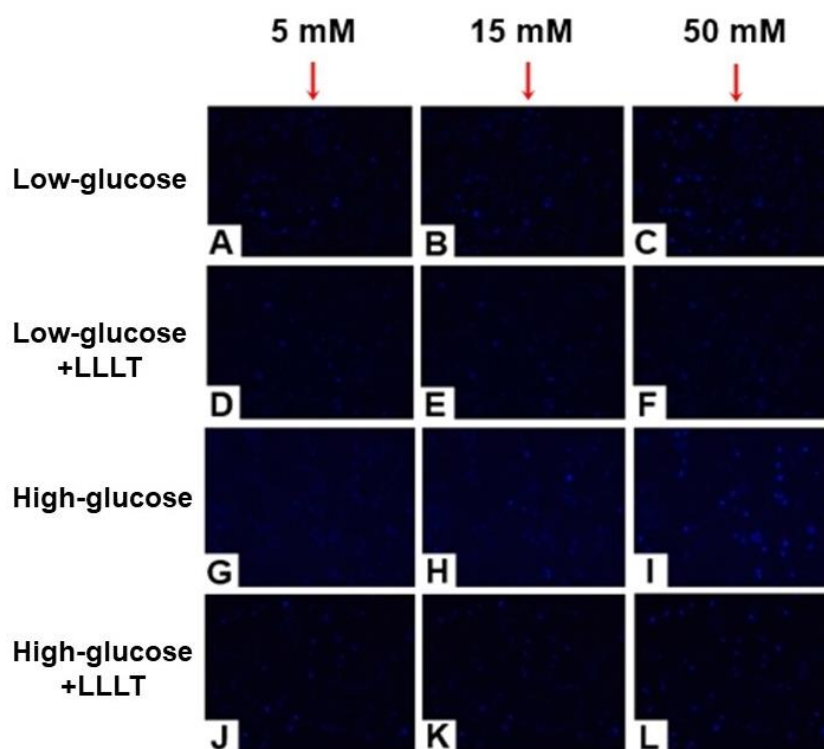


Figura 46. Imagens representativas da fluorescência relacionada ao $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante os incrementos da concentração de KCl no meio extracelular. As culturas de neurônios aferentes primários, a partir dos GRDs de ratos saudáveis (Naïve), foram mantidas em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose; grupo *Low-glucose*) (Painéis A a F) ou hiperglicêmico (55 mM de glicose; grupo *High-glucose*) (Painéis G a L) durante 24 h. Após este período, placas de cultura em meio normoglicêmico (Painéis D, E e F; grupo *Low-glucose+LLLT*) ou hiperglicêmico (Painéis J, K e L; grupo *High-glucose+LLLT*) foram expostas à LLLT (AsGa, 904 nm; 2,03 J; 29 s; *swiping motion*). Após a incubação com Fluo-4, AM, as placas de cultura receberam estímulo com KCl em diferentes concentrações: 5 mM (Painéis A, D, G e J), 15 mM (B, E, H e K) e 50 mM (C, F, I e L). Houve aumento da intensidade de fluorescência para todos os grupos de neurônios durante o estímulo com KCl 50 mM, e particularmente, para o grupo *High-glucose*, durante o estímulo com KCl 15 mM (Painel H). Aumento de 10x.

Na quantificação da intensidade de fluorescência ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$), foram observadas diferenças significativas entre os grupos *Low-glucose* e *Low-glucose+LLLT* ($p < 0,05$; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni). Uma única exposição dos neurônios à LLLT (grupo *Low-glucose+LLLT*) foi capaz de reduzir a intensidade de fluorescência ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) destes, em comparação aos não-irradiados (grupo *Low-glucose*), durante o estímulo com alta concentração de potássio $\uparrow[\text{K}^+]_e$ (KCl 50 mM), conforme observado nas Figuras 47 e 48. Não foram observadas diferenças entre os demais grupos durante o pico de fluorescência (KCl 50 mM), entretanto, após o pico, ambos os grupos de neurônios em meio hiperglicêmico (grupos *High-glucose* e *High-glucose+LLLT*) apresentaram intensidade de fluorescência

($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) maior, em comparação aos normoglicêmicos (grupos *Low-glucose* e *Low-glucose+LLLT*).

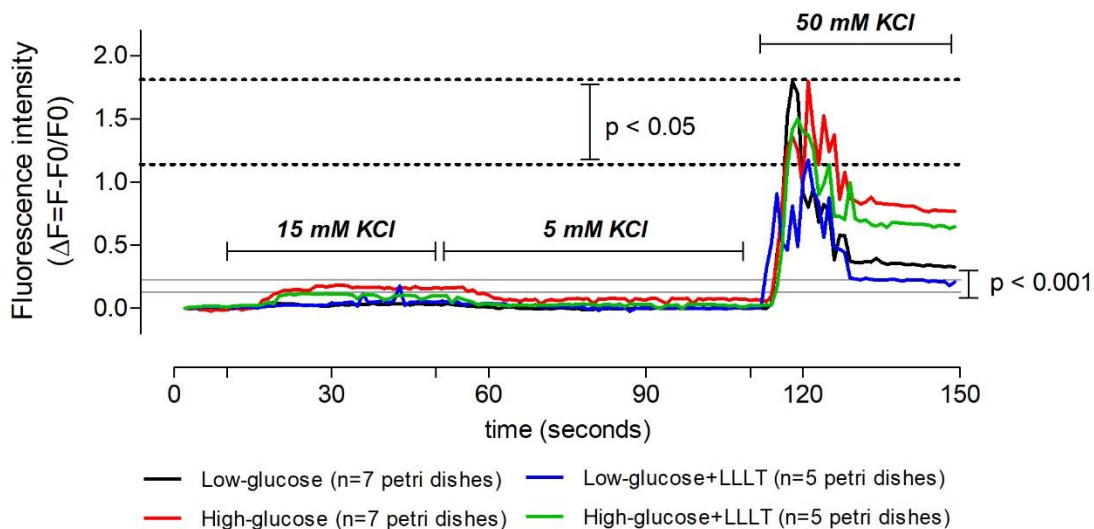


Figura 47. Dinâmica de cálcio intracelular: experimento *in vitro*. Os neurônios coletados a partir de GRDs de ratos Naïve, foram cultivados por 24 h em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose; grupo *Low-glucose*; **linha preta**) ou hiperglicêmico (55 mM de glicose; grupo *High-glucose*; **linha vermelha**) e expostos à LLLT (AsGa, 904 nm; 2,03 J; 29 s; *swiping motion*) (grupo *Low-glucose+LLLT*; **linha azul**; grupo *High-glucose+LLLT*; **linha verde**). Após a LLLT e o período de incubação com Fluo4, AM, os neurônios foram estimulados com diferentes concentrações de potássio $\uparrow[\text{K}^+]_e$ (KCl 5, 15 e 50 mM). Durante o estímulo com KCl 15 mM, o grupo *High-glucose* apresentou intensidade de fluorescência significativamente superior ao grupo *High-glucose+LLLT* ($p < 0,001$; **linhas cinzas contínuas**). Durante o maior pico de fluorescência, relativo ao estímulo com alta concentração de potássio (50 mM), não foram observadas diferenças entre os grupos com relação à concentração de glicose do meio (5,5 mM ou 55 mM de glicose). Entretanto, o grupo *Low-glucose+LLLT* apresentou menor intensidade de fluorescência em comparação ao grupo *Low-glucose*, durante o estímulo com KCl 50 mM ($p < 0,05$; **linhas pretas pontilhadas**). ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Dados expressos como a média de cada placa, para cada segundo.

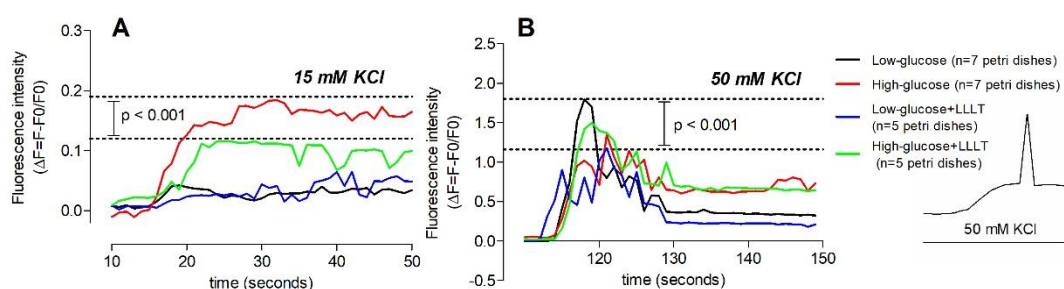


Figura 48. Dinâmica de cálcio intracelular: diferenças com relação à intensidade do estímulo (KCl 15 ou 50 mM). **Painel A:** Foi observada diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos *High-glucose* (linha vermelha) e *High-glucose+LLLT* (linha verde), durante o estímulo com a menor concentração de potássio (KCl 15 mM). Da mesma maneira, ambos os grupos hiperglicêmicos (*High-glucose* e *High-glucose+LLLT*) apresentaram maior intensidade de fluorescência em comparação aos normoglicêmicos (*Low-glucose*, linha preta; *Low-glucose+LLLT*, linha azul). A hiperglicemia do meio (55 mM de glicose), favoreceu maior “sensibilização” dos neurônios, os quais tornaram-se mais responsivos à uma menor concentração de KCl (15 mM). **Painel B:** durante o maior pico de fluorescência, relativo ao estímulo com alta concentração de potássio (KCl 50 mM), não foram observadas diferenças entre os grupos com relação à concentração de glicose do meio, entretanto o grupo *Low-glucose+LLLT* apresentou menor intensidade de fluorescência em comparação ao *Low-glucose* ($p < 0,001$). À direita, pico representativo de um único neurônio, durante estímulo com alta concentração de potássio (KCl 50 mM). ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Dados expressos como a média de cada placa, para cada segundo.

Além da intensidade de fluorescência relacionada ao $\Delta[Ca^{2+}]_i$, foi realizado estudo populacional dos neurônios do GRD que responderam às diferentes concentrações de potássio (KCl 15 e 50 mM). Foi observada diferença significativa do número de neurônios responsivos no grupo *High-glucose* em comparação aos demais grupos (*High-glucose+LLLT*; *Low-glucose*; *Low-glucose+LLLT*), durante o estímulo com 15 mM de KCl ($p < 0,01$; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) (Figura 49, Painel A). No estímulo com alta concentração de potássio (KCl 50 mM), o grupo *Low-glucose* apresentou o maior número de neurônios responsivos, sendo estatisticamente superior ao grupo *Low-glucose+LLLT* ($p < 0,01$; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) (Figura 49, Painel B). A porcentagem de neurônios responsivos à menor concentração de potássio (KCl 15 mM), em relação ao total de neurônios responsivos ao estímulo máximo (KCl 50 mM), foi significativamente maior no grupo *High-glucose* em comparação aos normoglicêmicos (*Low-glucose* e *Low-glucose+LLLT*) ($p < 0,001$; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni), e em relação ao *High-glucose+LLLT* ($p < 0,05$; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni), como observado na Figura 49, Painel C.

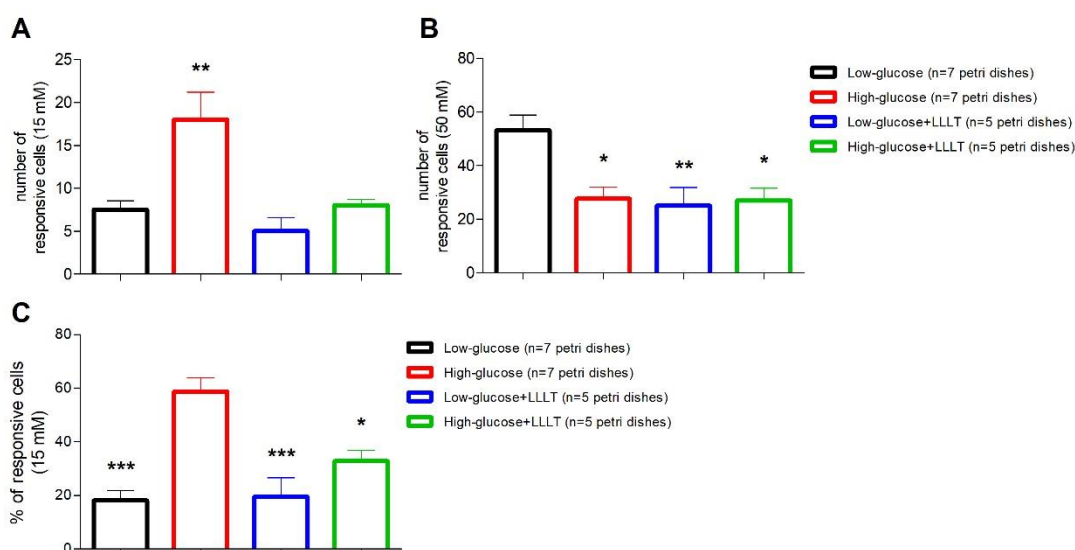


Figura 49. Dinâmica de cálcio intracelular (*in vitro*): estudo populacional. **Painel A:** O número de células que responderam ao estímulo KCl a 15 mM foi significativamente maior ($p < 0,01$) no grupo *High-glucose* (barra vermelha) em relação aos demais grupos (*High-glucose+LLLT*, barra verde; *Low-glucose*, barra preta; *Low-glucose+LLLT*, barra azul). **Painel B:** para o estímulo com alta concentração de potássio (KCl 50 mM), o grupo *Low-glucose* apresentou maior número de células responsivas em comparação aos grupos *Low-glucose+LLLT* ($p < 0,01$), *High-glucose* ($p < 0,05$) e *High-glucose+LLLT* ($p < 0,05$). **Painel C:** foi realizado cálculo do percentual (%) de neurônios responsivos à menor concentração de KCl (15 mM), em relação ao total de neurônios viáveis, os quais tendem a responder ao estímulo com alta concentração de potássio (KCl 50 mM). Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,001$) entre o grupo *High-glucose* e os demais grupos (*Low-glucose*, $p < 0,001$; *Low-glucose+LLLT*, $p < 0,001$; *High-glucose+LLLT*, $p < 0,05$), de maneira que maior número de neurônios responderam ao estímulo com menor concentração de potássio (KCl 15 mM), quando previamente mantidas em meio de cultura hiperglicêmico (55 mM de glicose). ANOVA *one-way*, seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolos (*), (**) e (***) representam $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.15 Efeitos da LLLT sobre o potencial de membrana mitocondrial (MMP) dos neurônios do GRD, por TMRE (Tetramethylrhodamine, ethyl ester) (*fast-term response*)

Conforme descrito no item 4.17, foi realizada análise do potencial de membrana mitocondrial (MMP) em neurônios do GRD mantidos por 24 h em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose; grupos *Low-glucose* e *Low-glucose+LLLT*) ou hiperglicêmico (55 mM de glicose; grupos *High-glucose* e *High-glucose+LLLT*) e expostos à LLLT, por meio do sistema COFS (904 nm; ~20 mW de potência de saída; energia total de 2,03 J; 29 s de exposição), em tempo real (*fast-term response*). Foi observada redução significativa ($p < 0,001$; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) do MMP, proporcional à intensidade de

fluorescência (ΔF) emitida por TMRE, em neurônios do grupo *High-glucose*, em comparação ao grupo *Low-glucose*, durante 24 h (Figura 50, Painéis A e B).

Após a aplicação da LLLT, no 360.^o e no 720.^o segundo do *time lapse*, foram observados aumentos imediatos (*fast-term response*) da intensidade de fluorescência (ΔF), seguidos por um aumento gradual, tanto em neurônios mantidos em meio normoglicêmico (grupo *Low-glucose+LLLT*), quanto naqueles mantidos em meio hiperglicêmico (grupo *High-glucose+LLLT*). Nestes, houve aumento significativo da intensidade de fluorescência (ΔF) após a aplicação da LLLT, em comparação aos demais grupos ($p < 0,001$; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni). Uma vez cessado o estímulo, a intensidade de fluorescência (ΔF) não retornou aos valores basais, em todos os grupos de neurônios (Figura 50, Painéis A e B).

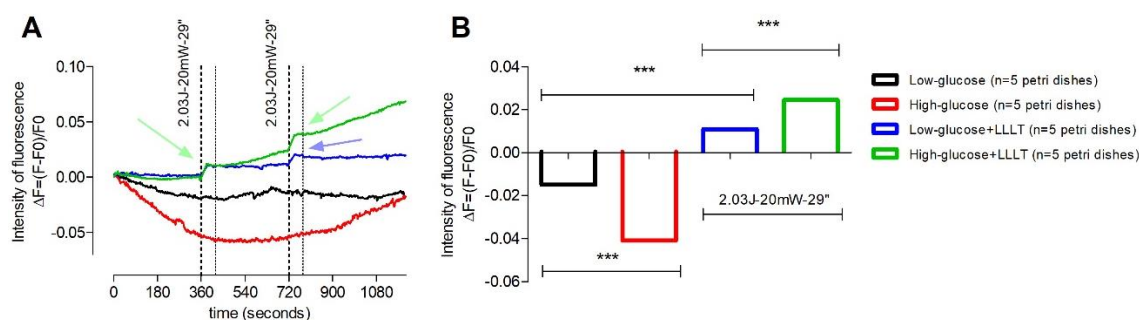


Figura 50. Potencial de membrana mitocondrial (MMP) de neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT. Painel A: Gráfico de linhas mostrando a intensidade de fluorescência normalizada ($\Delta F = (F - F_0) / F_0$) de neurônios do grupo *Low-glucose* (linha preta) e *High-glucose* (linha vermelha), submetidos à LLLT por meio do sistema COFS (904 nm; ~20 mW de potência de saída; energia total de 2,03 J; 29 s de exposição) (grupos *Low-glucose+LLLT* e *High-glucose+LLLT*; linhas azul e verde, respectivamente). As linhas pontilhadas verticais delimitam os períodos de aplicação da LLLT, após 360 e 720 segundos de *time lapse*. As setas verdes e azuis apontam para aumentos do MMP (*fast-term response*), atribuídos ao TMRE sequestrado pelas mitocôndrias ativas, logo após início da LLLT. **Painel B:** gráfico de barras mostrando a intensidade de fluorescência normalizada ($\Delta F = (F - F_0) / F_0$), considerando a soma de todo o *time lapse*. Houve redução significativa do MMP ($p < 0,001$) nos neurônios do grupo *High-glucose* (barra vermelha) em comparação ao grupo *Low-glucose* (barra preta), e também aumento significativo do MMP ($p < 0,001$) nos grupos *Low-glucose+LLLT* (barra azul) e *High-glucose+LLLT* (barra verde) em comparação aos respectivos grupos sem tratamento. ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolo (***) representa $p < 0,001$. Os valores são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.15.1 O efeito da LLLT no potencial de membrana mitocondrial (MMP) de neurônios do GRD depende parcialmente da ativação dos complexos mitocondriais I e III

Após observarmos o efeito da LLLT sobre o MMP de neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico, nós verificamos se o aumento da intensidade de fluorescência (ΔF) emitida pelo TMRE, está relacionado à ativação dos complexos mitocondriais I e III. Para isso, utilizamos inibidores específicos dos respectivos complexos: Rotenona (ROT, inibidor do complexo I) e Antimicina A (AMA, inibidor do complexo III), compondo os grupos *Low-glucose+LLLT+ROT+AMA* e *High-glucose+LLLT+ROT+AMA*. Foi observado que o aumento do MMP promovido pela LLLT foi prevenido, parcialmente, na presença dos inibidores ROT e AMA, especialmente para o grupo *Low-glucose+LLLT+ROT+AMA* (Figura 51, Painel A). Houve redução significativa ($p < 0,001$; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) da intensidade de fluorescência (ΔF) nos grupos *Low-glucose+LLLT+ROT+AMA* e *High-glucose+LLLT+ROT+AMA*, na comparação com os grupos *Low-glucose+LLLT* e *High-glucose+LLLT*, sem a presença dos inibidores (Figura 51, Painel B).

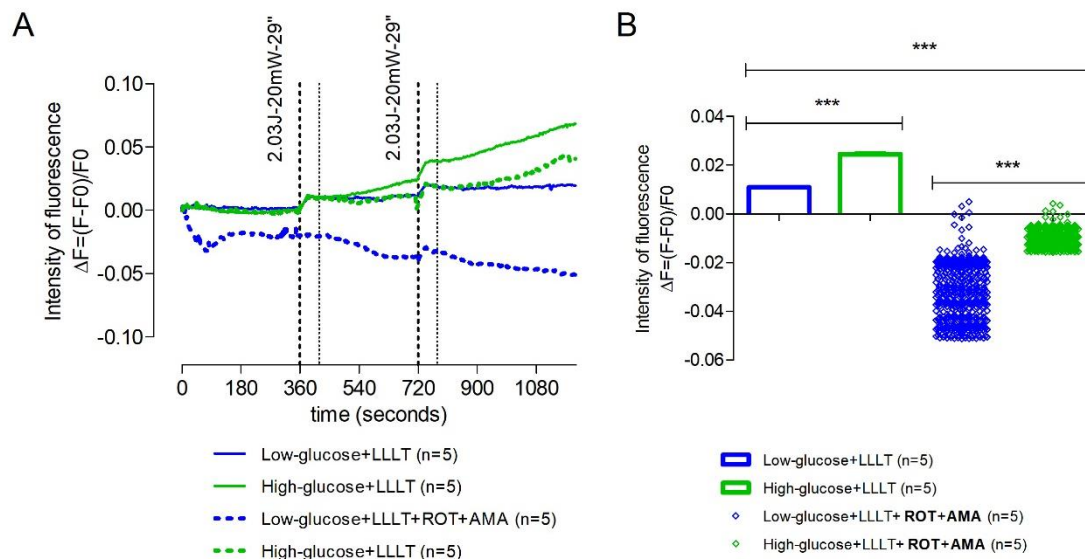


Figura 51. O efeito da LLLT no potencial de membrana mitocondrial (MMP) de neurônios do GRD depende parcialmente da ativação dos complexos mitocondriais I e III. Painel A: Gráfico de linhas mostrando a intensidade de fluorescência normalizada ($\Delta F = (F - F_0) / F_0$) de neurônios dos grupos *Low-glucose+LLLT* e *High-glucose+LLLT*, submetidos à LLLT por meio do sistema COFS (904 nm; ~20 mW de potência de saída; energia total de 2,03 J; 29 s de exposição) (linhas azul e verde contínuas, respectivamente), na presença de inibidores dos complexos mitocondriais I e III [Rotenona (ROT) e Antimicina A (AMA), respectivamente] (grupos *Low-glucose+LLLT+ROT+AMA* e *High-glucose+LLLT+ROT+AMA*; linhas azul e

verde pontilhadas, respectivamente). Houve redução da intensidade de fluorescência (ΔF) em ambos os grupos que receberam os inibidores ROT e AMA (*Low-glucose+LLLT+ROT+AMA* e *High-glucose+LLLT+ROT+AMA*) em comparação aos que foram expostos à LLLT sem a presença dos inibidores (grupos *Low-glucose+LLLT* e *High-glucose+LLLT*). As linhas pontilhadas verticais delimitam os períodos de aplicação da LLLT, após 360 e 720 segundos do *time lapse*. **Painel B:** gráfico de barras mostrando a intensidade de fluorescência normalizada ($\Delta F = (F - F_0) / F_0$), considerando a soma de todo o *time lapse*. Houve redução significativa do MMP ($p < 0,001$) nos neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT na presença dos inibidores ROT e AMA [grupos *Low-glucose+LLLT+ROT+AMA* (símbolos azuis) e *High-glucose+LLLT+ROT+AMA* (símbolos verdes)], em comparação aos grupos expostos à LLLT sem a presença dos inibidores [grupos *Low-glucose+LLLT* (barra azul) e *High-glucose+LLLT* (barra verde)]. ANOVA *one-way* seguido por Bonferroni post-hoc test. Símbolo (***) representa $p < 0,001$. Os valores são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.16 Potencial de membrana neuronal por FluoVolt™ Membrane Potential Probe (*ultra fast-term response*) de neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT

Conforme descrito no item 4.18, foi verificada a influência da LLLT sobre o potencial de membrana dos neurônios do GRD, mantidos por 24 h em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose; grupos *Low-glucose* e *Low-glucose+LLLT*) ou hiperglicêmico (55 mM de glicose; grupos *High-glucose* e *High-glucose+LLLT*). Assim como para a análise do potencial de membrana mitocondrial (MMP), a LLLT foi aplicada por meio do sistema COFS (904 nm; ~20 mW de potência de saída; energia total de 2,03 J; 29 s de exposição), em tempo real (*ultra fast-term response*). A fluorescência total, atribuída ao FluoVolt™ (sensível às alterações do potencial elétrico da membrana neuronal), foi capturada e normalizada pela fluorescência basal ($\Delta F = (F - F_0) / F_0$).

Foi observado aumento da intensidade de fluorescência (ΔF) para todos os grupos de neurônios no decorrer do *time lapse*. Imediatamente após a segunda aplicação da LLLT (720.º segundo do *time lapse*), foi observada uma redução abrupta da intensidade de fluorescência (ΔF) no grupo *High-glucose+LLLT* (Figura 52, Painel A). Considerando a soma da intensidade de fluorescência (ΔF) de todo *time lapse*, o grupo *High-glucose+LLLT* apresentou ΔF significativamente menor ($p < 0,001$; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) em comparação aos demais grupos, conforme demonstra a Figura 52, Painel B.

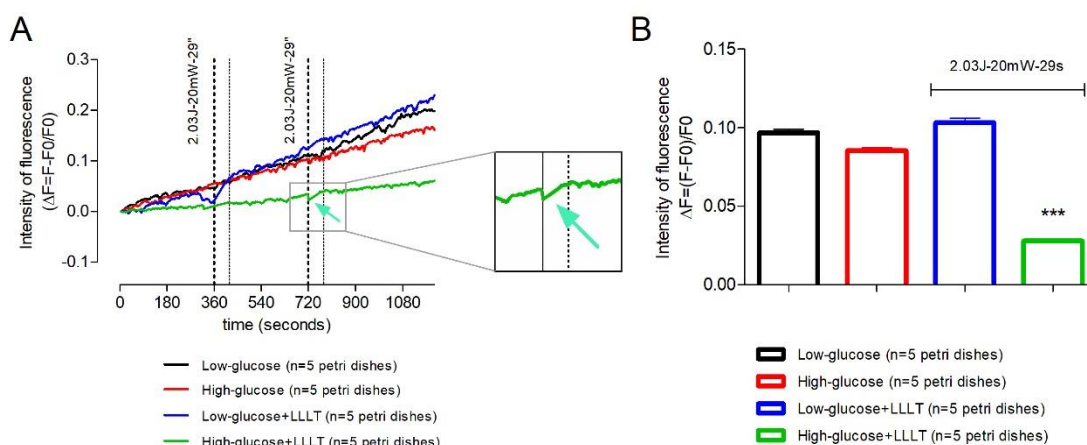


Figura 52. Potencial de membrana (FluoVolt™) de neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT. Painel A: Houve aumento da intensidade de fluorescência (ΔF), relacionada às alterações no potencial de membrana neuronal, para todos os grupos durante o *time lapse*. Após a aplicação da LLLT no 720.º s, ocorreu uma redução abrupta (seta verde, com aumento) do ΔF no grupo *High-glucose+LLLT* (linha verde). Painel B: estatisticamente, considerando a soma de todo *time lapse*, o grupo *High-glucose+LLLT* (barra verde) apresentou ΔF significativamente menor ($p < 0,001$), na comparação com os grupos *High-glucose* (barra vermelha), *Low-glucose* (barra preta) e *Low-glucose+LLLT* (barra azul). ANOVA *one-way* seguido por Bonferroni post-hoc test. Símbolo (***) representa $p < 0,001$. Linhas pontilhadas verticais delimitam os períodos de aplicação da LLLT. Os valores são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

5.17 Patch clamp *whole-cell* dos neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT

O potencial elétrico da membrana neuronal de neurônios do GRD, mantidos por 24 h em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose; grupo *Low-glucose*) ou hiperglicêmico (55 mM de glicose; grupo *High-glucose*) e expostos à LLLT (grupos *Low-glucose+LLLT* e *High-glucose+LLLT*), foi analisado por patch clamp *whole-cell*, na configuração “*voltage*”. Paralelamente ao *patch clamp recording*, os neurônios do GRD foram expostos à LLLT por meio do sistema COFS, em tempo real. A extremidade da fibra óptica (*output*) foi posicionada perpendicularmente à placa de cultura, em contato com o meio, conforme ilustrado na Figura 53.

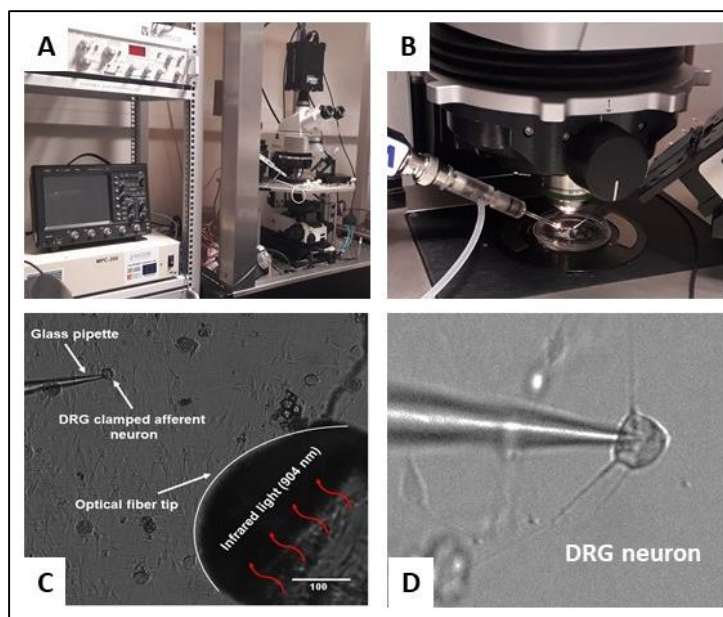


Figura 53. *Setup* do experimento de Patch clamp *whole-cell* de neurônios do GRD em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT. **Painel A:** disposição dos equipamentos para o *patch clamp recording* acoplados ao sistema de microscopia invertida. **Painel B:** as gravações do potencial de membrana neuronal foram realizadas em paralelo à exposição dos neurônios à LLLT (904 nm; ~20 mW de potência de saída; energia total de 2,03 J; 29 s de exposição), por meio do sistema COFS. **Painel C:** imagem ilustrativa da disposição da pipeta de vidro, no momento do clampeamento da membrana de um neurônio do GRD. No canto inferior direito, a extremidade da fibra óptica, posicionada perpendicularmente à placa de cultura, e controlada por um micromanipulador. Escala = 100 μ M. **Painel D:** imagem com ampliação de um neurônio do GRD clampeado durante o patch. A LLLT foi aplicada em 10 s após o início das gravações, com o equipamento ajustado para o modo “*voltage*”. A resistência média da pipeta de vidro durante o patch foi de 6 M Ω .

Primeiramente, a excitabilidade dos neurônios do GRD foi examinada pela mensuração do potencial de repouso da membrana neuronal (RMP; *resting membrane potential*), da reobase e do limiar de excitabilidade da membrana (*membrane threshold*). O RMP, de aproximadamente -30 mV, foi adquirido a partir de um neurônio do GRD em meio normoglicêmico. O valor obtido de reobase foi de 300 pA, a partir da injeção de pulsos de corrente quadrada, que variaram de -20 pA a 500 pA de intensidade e 0,2 s de duração. Por meio de injeção de corrente em rampa, a membrana neuronal foi continuamente despolarizada até que o potencial de ação (AP) fosse deflagrado. O limiar de excitabilidade da membrana foi observado em -38 mV. A amplitude do AP foi de 105 mV, com duração de 5 ms (Figura 54).

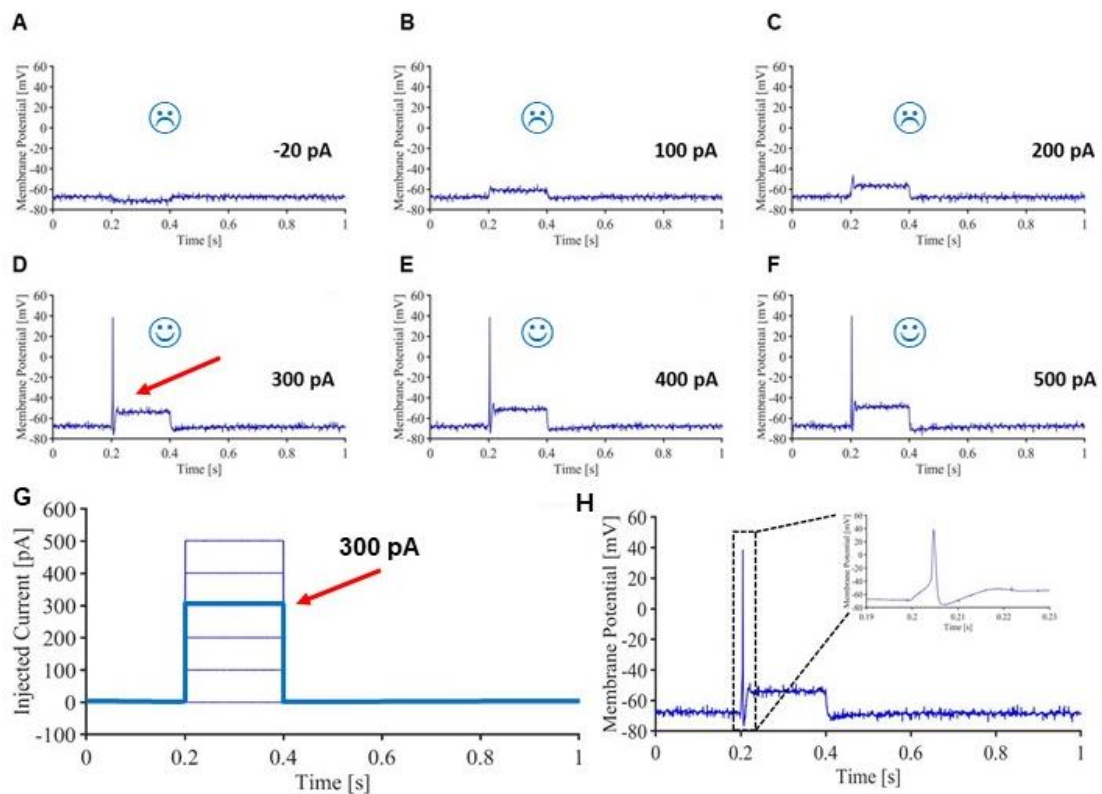


Figura 54. Testes da excitabilidade da membrana dos neurônios do GRD: reobase, potencial de repouso (RMP) e limiar de excitabilidade da membrana. A reobase (menor intensidade de corrente suficiente para deflagar um potencial de ação), foi medida após série de injeções de corrente quadrada, variando de -20 a 500 pA, com duração de 0,2 s (**Painéis A a F**). O valor de reobase foi encontrado em 300 pA (**Painéis D e G; setas vermelhas**). **Painel H:** zoom do potencial de ação (AP) de neurônio do GRD, deflagrado após a injeção de corrente de 300 pA. A amplitude do AP foi de aproximadamente 105 mV, com duração de aproximadamente 5 ms, considerando do seu ponto de início até o ponto em que a RMP volta ao valor basal, que neste caso foi de aproximadamente -30 mV. O limiar de excitabilidade da membrana neuronal foi observado em -38 mV.

Para avaliar o efeito da LLLT sobre o potencial de membrana dos neurônios do GRD, a injeção de corrente foi substituída pela LLLT, aplicada após 10 s do início do patch clamp *recording*. Tanto no meio normoglicêmico (grupo *Low-glucose+LLLT*), quanto no meio hiperglicêmico (*High-glucose+LLLT*), a LLLT não levou à deflagração de APs, tampouco produziu hiperpolarização do potencial de repouso da membrana neuronal, ou dificultou a geração de novos APs, conforme observado na Figura 55 (Painéis A e B).

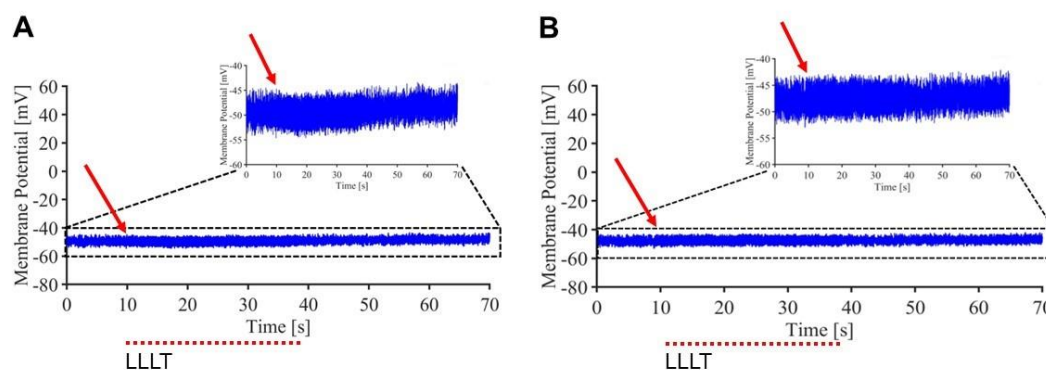


Figura 55. Potencial de membrana neuronal por patch clamp *whole-cell* de neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT. Painel A: Potencial de membrana, em mV, de um neurônio do GRD mantido por 24 h em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose) e exposto à LLLT (904 nm; ~20 mW de potência de saída; energia total de 2,03 J; 29 s de exposição) por meio do sistema COFS (grupo *Low-glucose+LLLT*) após 10 s de patch clamp *recording*. **Painel B:** potencial de membrana, em mV, de um neurônio do GRD mantido por 24 h em meio hiperglicêmico (55 mM de glicose) e exposto à LLLT (904 nm; ~20 mW de potência de saída; energia total de 2,03 J; 29 s de exposição) por meio do sistema COFS (grupo *High-glucose+LLLT*) após 10 s de patch clamp *recording*. **Setas vermelhas** indicam o início da aplicação da LLLT e **linha vermelha pontilhada** representa a duração da LLLT; **traço azul superior** refere-se à ampliação do inferior. Para ambos os grupos, *Low-glucose+LLLT* e *High-glucose+LLLT*, não foram observados efeitos da LLLT sobre o potencial de membrana neuronal dos neurônios do GRD.

5.18 Ensaio de viabilidade celular por MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]} de neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT

A viabilidade celular de neurônios do GRD mantidos por 24 h em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose; grupo *Low-glucose*) ou hiperglicêmico (55 mM de glicose; grupo *High-glucose*) e expostos à LLLT (grupos *Low-glucose+LLLT* e *High-glucose+LLLT*), foi analisada por ensaio de MTT. Com base na absorbância (u. a.), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de neurônios que foram expostos ou não à LLLT em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose; grupos *Low-glucose* e *Low-glucose+LLLT*). Os grupos de neurônios mantidos em meio hiperglicêmico (55 mM de glicose; *High-glucose* e *High-glucose+LLLT*) apresentaram absorbância significativamente menor ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) em comparação aos grupos *Low-glucose* e *Low-glucose+LLLT*. A absorbância (u. a.) dos grupos de neurônios mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico (*Low-glucose* e *High-glucose*, respectivamente), bem como daqueles expostos à LLLT (*Low-*

glucose+LLLT e *High-glucose+LLLT*), foi significativamente diferente ($p < 0,001$; ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni) em relação aos grupos-controle de morte celular (*Low-glucose+DMSO* e *High-glucose+DMSO*), conforme observado na Figura 56 (Painel A). A análise baseada na porcentagem de viabilidade celular (%) de todos os grupos em relação ao grupo *Low-glucose* (considerado 100 % viável) apresentou as mesmas diferenças observadas na análise com base na absorbância (Figura 56, Painel B).

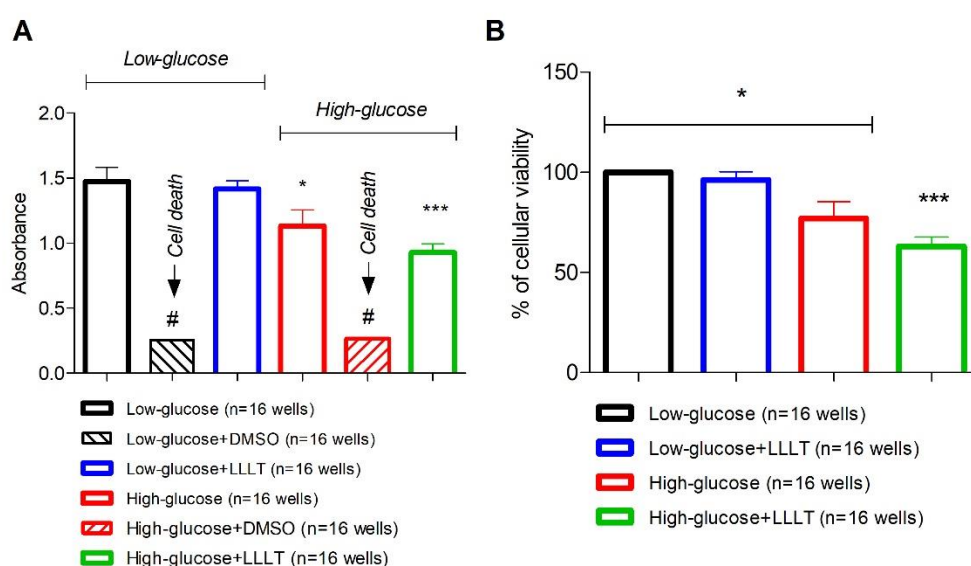


Figura 56. Ensaio de viabilidade celular por MTT de neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico e expostos à LLLT. Painel A: Não foram observadas diferenças significativas na viabilidade celular, com base na absorbância (u. a.), entre os grupos *Low-glucose* (barra preta) e *Low-glucose+LLLT* (barra azul), mas destes em relação ao controle de morte celular (*Low-glucose+DMSO*; listras pretas diagonais) ($p < 0,001$). O grupo *High-glucose* (barra vermelha) apresentou absorbância (u. a.) significativamente inferior ($p < 0,05$) em relação aos grupos *Low-glucose* e *Low-glucose+LLLT*, mas não se igualou ao controle de morte celular (*High-glucose+DMSO*; listras vermelhas diagonais). O grupo *High-glucose+LLLT* (barra verde) apresentou absorbância significativamente inferior ($p < 0,001$) ao *Low-glucose+LLLT*. Não houve diferença entre os grupos *High-glucose* e *High-glucose+LLLT*. **Painel B:** gráfico de barras mostrando a porcentagem (%) de viabilidade celular. Foram observadas as mesmas diferenças descritas em relação à absorbância (u. a.) ANOVA *one-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolos (*) e (***) representam $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente; símbolo (#) representa $p < 0,001$ na comparação dos grupos *Low-glucose+DMSO* e *High-glucose+DMSO* aos demais; u. a. = unidades arbitrárias. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

A partir dos resultados observados no ensaio de MTT, o meio hiperglicêmico (55 mM de glicose) levou a redução da viabilidade celular dos neurônios do GRD, em comparação àqueles mantidos em meio normoglicêmico (5,5 mM de glicose), entretanto, não gerou o

mesmo nível de morte celular causado pelo DMSO (14,1 M). Com base nessa redução da viabilidade celular dos neurônios mantidos em meio hiperglicêmico, decidimos realizar o mesmo protocolo em períodos adicionais (48, 72, 96 e 120 h) para verificar a partir de que momento os neurônios em meio hiperglicêmico começam, de fato, a entrar em apoptose. Esta análise também nos permitiu verificar se a LLLT pode atuar protegendo os neurônios da morte celular, retardando este processo.

Os resultados de absorbância (u. a.) obtidos no *time course* do MTT, demonstraram que após 24 h os neurônios dos grupos *High-glucose* e *High-glucose+LLLT* têm sua viabilidade reduzida em comparação aos grupos *Low-glucose* e *Low-glucose+LLLT*, reproduzindo os resultados de MTT demonstrados anteriormente. Uma única exposição dos neurônios à LLLT (período de 24 h) não foi capaz de aumentar a viabilidade celular com base na absorbância (Figura 57). Entretanto, com o passar do tempo e a somação de exposições, a redução da absorbância em neurônios expostos à LLLT foi menor em comparação àqueles não-irradiados. Nos períodos de 48 e 72 h, os neurônios dos grupos *Low-glucose+LLLT* e *High-glucose+LLLT*, apresentaram absorbância superior em relação aos demais ($p < 0,05$; $p < 0,001$, respectivamente; ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni). Em 120 h, o grupo *High-glucose+LLLT* apresentou absorbância significativamente maior do que os demais grupos ($p < 0,001$; ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni), mesmo quando comparado aos grupos *Low-glucose* e *Low-glucose+LLLT*, conforme observado no gráfico da Figura 57.

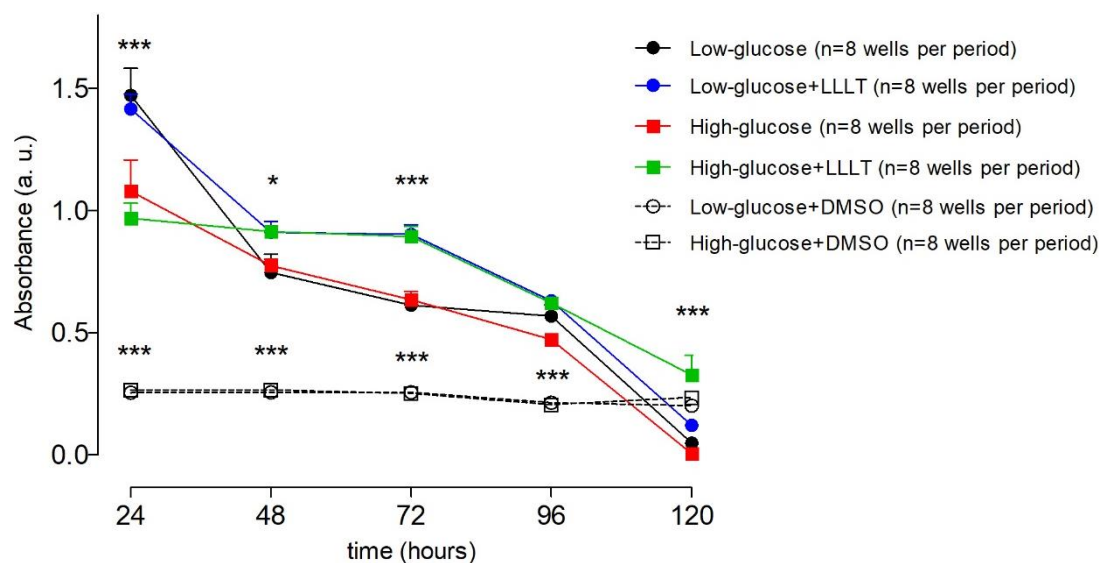


Figura 57. Viabilidade celular por MTT (time course) com base na absorbância. Em 24 h de cultura, a hiperglicemia do meio (55 mM de glicose) (grupo *High-glucose*, **quadrados vermelhos**; grupo *High-glucose+LLLT*, **quadrados verdes**) levou a redução da viabilidade dos neurônios do GRD. Uma única exposição dos neurônios mantidos em meio hiperglicêmico à LLLT (grupo *High-glucose+LLLT*) não gerou melhora da viabilidade celular. Entretanto, com o passar do tempo e a soma de exposições, a absorbância (u. a.) em neurônios expostos à LLLT (grupos *High-glucose+LLLT* e *Low-glucose+LLLT*, **círculos azuis**) foi maior em comparação àqueles não-irradiados (grupos *Low-glucose*, **círculos pretos**, e *High-glucose*), especialmente em 48 h ($p < 0,05$) e 72 h ($p < 0,001$). Após 120 h, o grupo *High-glucose+LLLT* apresentou absorbância significativamente maior ($p < 0,001$) em comparação aos demais grupos. A absorbância (u. a.) de neurônios dos grupos *Low-glucose+DMSO* (círculos transparentes) e *High-glucose+DMSO* (quadrados transparentes), diferiram dos demais grupos ($p < 0,001$) até o período de 96 h. ANOVA *two-way* seguido por pós-teste de Bonferroni. Símbolos (*) e (***) representam $p < 0,05$ e $p < 0,001$; u. a. = unidades arbitrárias. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

6 DISCUSSÃO

6.1 A indução do diabetes tipo I (T1D) por múltiplas doses de estreptozotocina (STZ)

Evidências de embasamento (*highlights*)

- O protocolo de múltiplas doses de estreptozotocina (STZ), 25 mg/kg/dia, foi eficaz para o desenvolvimento do diabetes tipo 1 (T1D) em ratos Lewis isogênicos após 5 injeções;
- A LLLT não apresentou efeitos sobre a hiperglicemia, massa corpórea e outros sinais clínicos do T1D, como poliúria, polidipsia e polifagia.

A estreptozotocina (STZ) é um antibiótico com atividade diabetogênica, por induzir a destruição das células β -pancreáticas, sendo amplamente utilizado em experimentação animal para produzir modelo de diabetes mellitus tipo I (T1D) (WU & HUAN, 2007). Os animais sujeitos às injeções de STZ apresentam deficiência na produção de insulina, hiperglicemia, polidipsia e poliúria (FURMAN, 2015). O protocolo de múltiplas doses de STZ durante 5 dias foi descrito por Like e Rossini (1976), como a melhor opção para promover uma destruição parcial das ilhotas pancreáticas, desencadeando um processo inflamatório que culmina na morte das células- β . Este processo ocorre gradualmente durante os 5 dias do protocolo e pode reduzir o efeito tóxico da STZ, em comparação com o protocolo de única dose (KOLB, 1987; KOLB-BACHOFEN *et al.*, 1988; WEIDE & LACY, 1991). Em nosso modelo, todos os animais que receberam as múltiplas doses de STZ tornaram-se diabéticos, de maneira irreversível, e permaneceram vivos até o final dos experimentos, corroborando com outros estudos que foram previamente desenvolvidos em nosso laboratório (ATHIÉ *et al.*, 2018; TEIXEIRA *et al.*, 2019, do PRADO *et al.*, 2020).

O tratamento com LLLT não influenciou nos níveis de hiperglicemia, tampouco nos outros sinais clínicos do T1D (polidipsia, poliúria, perda de peso). De acordo com Peplow *et al.* (2012), o efeito da LLLT na cicatrização de úlceras em pacientes diabéticos foi eficaz pela ação local da irradiação (660 nm; 100 mW; 4,7 – 6,3 J/cm²; 20 s), e não por influenciar na redução da hiperglicemia ou na condição metabólica geral do diabetes. Em contrapartida, o tratamento com laser infravermelho (810 nm; 1 J/cm²), usado por Longo (2008) sobre o abdômen de pacientes portadores de T1D e T2D, causou um efeito hipoglicêmico que ainda não foi compreendido.

6.2 Caracterização das alterações da função motora dinâmica na neuropatia diabética e efeitos da LLLT¹⁰

Evidências de embasamento (*highlights*)

- A neuropatia diabética periférica promoveu alterações nos parâmetros de intensidade das pegadas, caracterizados por menor pressão aplicada pela face plantar das patas traseiras dos ratos, especialmente no 14º dia do protocolo experimental;
- Parâmetros espaciais da marcha, analisados pelo sistema CatWalk XT, como Comprimento da Passada (*Stride Length*) (cm), Área da Pegada (*Print Area*) (cm²) e Área Máxima de Contato (*Max Contact Area*) (cm²), mostraram-se alterados no decorrer das 4 semanas do protocolo experimental, com forte correlação com o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica, observada especialmente no 14º, 21º e 28º dia;
- A LLLT, aplicada entre o 21º e 28º dia do protocolo experimental, levou à melhora dos parâmetros espaciais da marcha, em paralelo ao efeito anti-hiperalgésico promovido pela terapia.

Clinicamente, a dor é o sintoma mais importante da neuropatia diabética periférica, com prevalência tanto nas extremidades dos membros superiores quanto inferiores, afetando a qualidade de vida dos pacientes (ZOCHODNE, 1996; WRIGHT *et al.*, 2004). De acordo com Zochodne *et al.* (2008), o diabetes não controlado promove danos aos neurônios sensoriais antes mesmo do envolvimento dos neurônios motores. Esta condição é caracterizada por perda da inervação da pele e retração dos neurofilamentos distais (KAMBIZ *et al.*, 2015).

Além da dor, caracterizada por alodinia e hiperalgesia, a neuropatia diabética pode estar associada a alterações do potencial de ação neuronal e da junção neuromuscular, refletindo em um posicionamento anormal do membro inferior e menor aplicação de pressão durante a marcha (ZOCHODNE *et al.*, 2008), como já relatado em alguns estudos (SCHWARTZ *et al.*, 2008; BENITEZ *et al.*, 2015). Este padrão biomecânico alterado, pode explicar o fato de que camundongos em fase avançada do diabetes induzido por STZ, apresentem perda de axônios periféricos, os quais projetam-se para a região distal do membro posterior (AKKINA *et al.*, 2001; CHRISTIANSON *et al.*, 2003). Nesse contexto, a análise da dinâmica da marcha pode representar um método interessante para verificar alterações funcionais relacionadas à neuropatia diabética periférica.

Parâmetros da marcha analisados pelo sistema CatWalk XT, como Intensidade Média, duração do Apoio e Balanço, têm sido relacionados à hiperalgesia mecânica em modelos de dor neuropática decorrente de constrição do nervo periférico (VRINTEN & HAMERS, 2003).

¹⁰ Discussão complementar sobre este tópico pode ser consultada no artigo científico “*Gait analysis correlates mechanical hyperalgesia in a model of streptozotocin-induced diabetic neuropathy: a CatWalk dynamic motor function study*” (Apêndice 7).

Em nosso estudo, a Intensidade Máxima (*Maximum Intensity*) foi o principal parâmetro a demonstrar alteração no 14º dia após o início das injeções de STZ, corroborando dados obtidos por Benitez e colaboradores (2015), sobre a análise da função motora dinâmica na neuropatia diabética periférica.

Os animais diabéticos, já com alterações do limiar mecânico no 14º dia, conforme observado nos resultados do teste de von Frey eletrônico para hiperalgesia mecânica, aplicaram menor pressão durante o contato das patas com a passarela de vidro do sistema CatWalk XT. Esta situação foi amenizada no decorrer dos dias, pois observamos que os valores de intensidade das pegadas retornaram àqueles próximos dos normais. Entretanto, há um mecanismo compensatório, isto é, os animais aplicam a mesma pressão, mas em uma menor área de contato. Esta redução na área de contato aumenta com o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica, em um forte padrão de correlação, especialmente no 28º dia. Esses achados estão de acordo com o padrão de alterações sensoriais da neuropatia diabética em humanos, conhecido como padrão em meia-e-luva (EDWARDS *et al.*, 2008; CALLAGHAN *et al.*, 2012), que ocorre como distúrbio sensorial das extremidades de membros, comprometendo as atividades de vida diária (AVDs).

Möller e colaboradores (2008) observaram redução no contato da pata e na área da pegada em ratos com artrite induzida por carragenina na articulação do joelho, mas, diferentemente do nosso estudo, os autores observaram alterações na duração do contato com a passarela (fase de Apoio, *Stand*). Esta característica é comum em disfunções musculares (VIEIRA *et al.*, 2016) e articulares analisadas pelo sistema CatWalk XT (GABRIEL *et al.*, 2007; MÖLLER *et al.*, 2008; ÄNGEBY-MÖLLER *et al.*, 2012). Nós acreditamos que a intensidade do contato da pata melhor representa a neuropatia diabética em comparação aos parâmetros espaço-temporais, como Apoio (*Stand*) e Balanço (*Swing*). Em contrapartida, Huehnchen *et al.* (2013) identificaram alterações em parâmetros espaço-temporais da marcha, também analisados a partir das patas traseiras de ratos com polineuropatia induzida pelo quimioterápico paclitaxel. Os autores observaram aumento no tempo da fase de Balanço (*Swing*) e consequentemente redução da fase de Apoio (*Stand*). Huehnchen e colaboradores (2013) também observaram alterações no Ciclo de Trabalho (*Duty Cycle*) (caracterizado pela fase de Apoio como porcentagem do Ciclo do Passo). Entretanto, em nosso estudo, o Ciclo de Trabalho (*Duty Cycle*) não apresentou alterações nos grupos STZ e SCB. Por outro lado, corroborando com nossos dados, Huehnchen *et al.* (2013) também verificaram uma redução na área de contato das patas traseiras 30 dias após as injeções de paclitaxel.

Após estabelecermos os parâmetros de marcha que se encontraram alterados na neuropatia diabética periférica, verificamos a influência da LLLT sobre os parâmetros fortemente correlacionados à hiperalgesia mecânica: Área Máxima de Contato (*Max Contact Area*) (cm²), Área da Pegada (*Print Area*) (cm²) e Comprimento da Passada (*Stride Length*) (cm). O tratamento com LLLT entre os dias 21 e 28 do protocolo experimental foi capaz de reestabelecer a Área Máxima de Contato (*Max Contact Area*) (cm²) e a Área da Pegada (*Print Area*) (cm²), as quais retornaram à valores próximos do controle (basal; pré-injeção de STZ).

São raros os trabalhos que avaliaram a influência da LLLT sobre parâmetros motores em modelos animais, especialmente tratando-se da análise pelo sistema CatWalk XT. Vieira *et al.* (2016) avaliaram a influência da LLLT por meio do laser AsGa (904 nm; 4 J/cm²) sobre as alterações motoras decorrentes da mionecrose induzida por veneno de *Bothrops jararacussu*. Em 3 h após a injeção do veneno, os animais apresentavam postura semifletida do membro posterior direito. Quando o tratamento com LLLT foi realizado, no mesmo período (3 h), os animais apresentaram Intensidade Máxima (u. a.), Apoio (s) e Balanço (s) mais próximos do controle. A postura de semiflexão pode representar um reflexo de proteção à um estímulo doloroso. Em nosso modelo, os animais não permaneceram em postura reflexa, entretanto aplicaram menos pressão (representada por menor intensidade e menor área de contato da pata) durante a marcha. A LLLT foi capaz de normalizar parte do padrão de marcha alterado que observamos na neuropatia diabética, o que pode estar relacionado ao efeito anti-hiperalgésico promovido pela terapia.

6.3 Efeitos da LLLT na redução da hiperalgesia mecânica decorrente da neuropatia diabética periférica

Evidências de embasamento (*highlights*)

- A aplicação da LLLT, especialmente nas doses de 2,03 J e 4,06 J, foi capaz de prevenir, parcialmente, o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica, quando o tratamento foi realizado diariamente, com início logo após a instalação do T1D;
- Após a instalação da NDP, o tratamento com LLLT, entre o 21º e o 28º dia do protocolo experimental, foi capaz de reduzir a intensidade da hiperalgesia mecânica em ratos diabéticos hiperalgésicos;
- O efeito anti-hiperalgésico da LLLT não foi relacionado a interações com parâmetros metabólicos do T1D, uma vez que os ratos submetidos à terapia não apresentaram alterações nos valores de hiperglicemia, massa corpórea e em outros sinais característicos do T1D, como poliúria, polidipsia e polifagia.

Em nosso estudo, a aplicação da LLLT durante e após o desenvolvimento da NDP apresentou resultados satisfatórios na redução da hiperalgesia mecânica decorrente do diabetes. Entretanto, assim como na prevalência de dor neuropática em humanos, cerca de 20-30 % dos ratos diabéticos não desenvolvem hiperalgesia após a instalação do T1D por STZ. Deste modo, o efeito da LLLT, quando aplicada durante o desenvolvimento da dor neuropática, pode se confundir à não ocorrência de hiperalgesia, intrínseca ao modelo de estudo. Por este motivo, decidimos avaliar os efeitos anti-hiperalgésicos da LLLT somente em ratos conhecidamente hiperalgésicos.

A dor neuropática possui fisiopatologia complexa e é por vezes incapacitante. Farmacologicamente, vários são os alvos terapêuticos usados no tratamento das neuropatias periféricas, entretanto, até hoje, poucos demonstraram eficácia. A maioria dos pacientes apresenta pequena melhora que regride antes mesmo do término do tratamento (HOLANDA *et al.*, 2017). A LLLT, também conhecida pelo seu termo mais abrangente, fotobiomodulação, vem sendo utilizada no tratamento clínico de vários tipos de dor neuropática e tem apresentado resultados satisfatórios (CHOW & BARNSELEY, 2005; CHOW *et al.*, 2009). Existem evidências na literatura do efeito anti-inflamatório da LLLT (BYRNES *et al.*, 2005; PELOW *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2013; von LEDEN *et al.*, 2013), mas pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos em seu efeito analgésico, ou anti-hiperalgésico, independente da inflamação do tecido.

A inibição direta da atividade neuronal pelo infravermelho tem sido um mecanismo plausível para explicar, em partes, o efeito analgésico da LLLT. Alguns estudos demonstraram redução da velocidade de condução nervosa de nervos periféricos expostos à irradiação por

laser (SNYDER-MACKLER *et al.*, 1988; MAEDA, 1989; WESSELMANN *et al.*, 1991; WAKABAYASHI *et al.*, 1993; KONO *et al.*, 1993). Holanda e colaboradores (2016) sugerem um possível efeito de “fotoneuromodulação”, uma vez que pacientes com dor lombar submetidos à irradiação por laser infravermelho (808 nm), na região lombar dos GRDs L4-L5, bilateralmente, relataram melhora rápida da dor, o equivalente a uma injeção de lidocaína. Nossos animais diabéticos neuropáticos apresentaram redução significativa da hiperalgesia mecânica durante e após o tratamento com LLLT. Entretanto, no grupo controle submetido à LLLT (SCB+LLLT) não houve anestesia, ou seja, o limiar mecânico foi mantido próximo do basal. A “fotoneuromodulação” poderia ser o evento chave no reequilíbrio da atividade neuronal afetada pelo diabetes, daí a importância do estudo dos efeitos da LLLT na dinâmica de cálcio intracelular e sobre o potencial de membrana neuronal, por exemplo, que será discutido mais adiante.

6.4 Detecção de MAPKs nos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos e efeitos da LLLT sobre a expressão destas proteínas

Evidências de embasamento (*highlights*)

- A LLLT levou a redução da expressão de p38 mRNA e, consequentemente à menor detecção da MAPK p-p38 nos GRDs L4-L5, conforme demonstrado nos resultados dos experimentos de RT-qPCR e imunofluorescência, respectivamente;
- A menor ativação de p38 nos GRDs L4-L5 ocorreu em paralelo à redução dos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 no grupo de ratos diabéticos hiperalgésicos submetidos à LLLT.

Há grande evidência de que, no diabetes, o tecido nervoso passe por um processo pró-inflamatório que contribui para o desenvolvimento da neuropatia (YAGIHASHI *et al.*, 2010). Deste modo, os “nervos diabéticos” apresentam macrófagos, ocasionalmente linfócitos e têm liberação aumentada de TNF- α e interleucinas pró-inflamatórias, tanto em humanos quanto em animais (YOUNGER *et al.*, 1996; CONTI *et al.*, 2002; YAGIHASHI *et al.*, 2007). No diabetes, a condição pró-inflamatória leva a ativação de proteínas quinases ativadas por estresse (relacionado à condição hiperglicêmica), as quais configuram a família das MAPKs. Essas proteínas quinases (principalmente p38, ERK1/2 e JNK) passaram a ser consideradas um alvo potencial para novos tratamentos da neuropatia diabética (TOMLINSON, 1999; YAMAGISHI *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2010).

As MAPKs são proteínas bem conservadas evolutivamente que conectam receptores da membrana celular a alvos regulatórios dentro da célula (CHANG & KARIN, 2001). As vias de sinalização que envolvem as MAPKs podem ser ativadas em resposta a uma ampla variedade de estímulos, como hormônios, fatores de crescimento, diversas citocinas pró-inflamatórias, estímulos físicos e químicos (ENGLISH *et al.*, 1999). A atividade das MAPKs é regulada por cascatas compostas de MAPK, MAPK quinase (MAPKK, MKK ou MEK) e MAPKK quinase ou MEK quinase (MAPKKK ou MEK). Estes módulos de MAPKs podem ser ativados por quinases STE20 ou pequenas proteínas ligadas ao GTP (GUTKIND, 2000).

A família das MAPKs inclui a proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK, incluindo ERK1/2), p38 MAPK (incluindo p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ) e a quinase c-Jun N-terminal ativada por estresse (SAPK/JNK, incluindo JNK1, JNK2 e JNK3) (JI *et al.*, 2009). A ERK5 foi incluída neste grupo, mas pouco se sabe a respeito do seu papel (JOHNSON & LAPADAT, 2002). Estas proteínas estão envolvidas em diversas funções celulares, como diferenciação, proliferação, sobrevivência e apoptose, por meio de uma complexa rede de interação. Além disso, as MAPKs parecem ser ativadas em resposta à inflamação e lesão nervosa (KENNEY & KOCSIS, 1998; MA *et al.*, 2002; WATSON *et al.*, 2001).

A ativação da via das MAPKs leva a ativação de NF- κ B, resultando na proliferação ou morte celular (WANG *et al.*, 2006; KUMAR & SHARMA, 2010). Também há forte participação da via dos polióis e formação exacerbada de produtos finais de glicação avançada (AGEs) que, dependendo da magnitude da sua formação, determinam se a inflamação é o principal processo iniciador ou influenciador da neuropatia diabética. Dada a complexidade das vias metabólicas envolvidas e o desequilíbrio destas causado pelo diabetes, ainda não foi encontrado um tratamento realmente efetivo para o tratamento da dor neuropática diabética.

A fosforilação de ERK1/2, p38 e JNK, pode resultar no aumento de peptídeo relacionado ao gene calcitonina induzido por morfina e de substância P nos neurônios aferentes sensoriais, contribuindo para o desenvolvimento de tolerância a analgesia induzida por opióide (MA *et al.*, 2002). Este e outros achados sugerem que as MAPKs desempenham importante papel na geração da hipersensibilidade à dor (CHANG & KARIN, 2001), o que pode incluir a dor neuropática e visceral (CIRUELA *et al.*, 2003; GALAN *et al.*, 2003).

A ativação das MAPKs sob diferentes condições de dor persistente resulta na indução e manutenção da hipersensibilidade via regulações transcricionais e não-transcricionais. Após lesão nervosa, por exemplo, ERK1/2, p38 e JNK são diferencialmente ativadas na micróglia e astrócitos, levando a síntese de mediadores pró-inflamatórios e pró-nociceptivos, aumentando

a intensidade da condição dolorosa. A inibição das vias de todos os três tipos de MAPKs parece atenuar tanto a dor inflamatória quanto a dor neuropática em diferentes modelos animais. O desenvolvimento de inibidores específicos das vias das MAPKs, com foco sobre os neurônios e glia, pode levar a novas terapias para o manejo da dor (JI *et al.*, 2009).

O controle da ativação das MAPKs com foco em um possível efeito analgésico, pode ser estudado a partir do emprego de outros recursos terapêuticos, não necessariamente farmacológicos, como a LLLT. Nossos resultados sugerem que esta terapia, por meio do laser infravermelho 904 nm, pode agir sobre a expressão das MAPKs, especialmente sobre a redução da ativação de p38. Esta, uma vez reduzida no grupo de animais diabéticos neuropáticos submetidos à LLLT, conforme observado nos resultados dos experimentos de RT-qPCR e imunofluorescência do GRD, pode estar relacionada ao efeito anti-hiperalgésico da LLLT, detectada pelas análises comportamentais de dor e função motora dinâmica.

A p38 MAPK é tipicamente ativada por estresse celular e citocinas pró-inflamatórias e participa de maneira crítica nas respostas inflamatórias. A administração sistêmica ou intratecal de inibidores de p38 tem demonstrado reverter a inflamação e artrite (KUMAR *et al.*, 2003; BOYLE *et al.*, 2006). O inibidor de p38 (SB203580) foi capaz de reduzir a hiperalgesia térmica induzida por inflamação e também a alodinia mecânica induzida pela ligadura do nervo espinhal em L5 (JI *et al.*, 2002; JIN *et al.*, 2003; SCHAFERS *et al.*, 2003). Uma vez ativada, a p38 é translocada para o núcleo, onde pode fosforilar fatores de transcrição como ATF-2. A biossíntese de TNF- α e IL-1 β , bem como de muitos outros mediadores inflamatórios é também regulada pela p38 (KUMAR *et al.*, 2003) e a sua inibição leva a redução significativa destes, com reflexos na redução da dor.

Hsieh e colaboradores (2011) observaram redução nos níveis de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β e HIF-1 α) em modelo de dor crônica, decorrente de constrição do nervo isquiático de ratos tratados com LLLT. Cidral-Filho *et al.* (2013) relataram redução da hiperalgesia mecânica e dos níveis de TNF- α em ratos submetidos à esmagamento do nervo isquiático e tratados com LLLT. Apesar de não se tratarem de neuropatia de origem diabética, estes estudos estão de acordo com nossos resultados no que diz respeito aos efeitos do laser infravermelho na redução dos níveis dos mediadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β e IL-6. Em paralelo à redução dos níveis de citocinas inflamatórias, nosso trabalho demonstra que a LLLT foi capaz de reduzir significativamente a expressão de p38 em ratos diabéticos neuropáticos, com tratamento iniciado após a instalação da neuropatia diabética (21° ao 28°

dia). Entretanto, há poucos trabalhos na literatura sobre os efeitos da LLLT sobre a via das MAPKs, especialmente relacionados à dor neuropática de origem diabética.

O estudo de Shefer *et al.* (2001) sobre o efeito da LLLT na modulação das MAPKs, mostrou que o laser He-Ne (632,8 nm) induziu ativação de células musculares esqueléticas por ativar especificamente MAPK/ERK, com nenhum efeito sobre a SAPK/JNK e p38 MAPK. Resultados parecidos foram obtidos no estudo de Graviela e colaboradores (2001), que testaram a ativação de células musculares por LLLT dependente de ERK e JNK, mas não de p38. Ambos os trabalhos (SHEFER *et al.*, 2001 e GRAVIELA *et al.*, 2001) não observaram influência da LLLT sobre a p38. Aleksic *et al.* (2010) usaram o laser Er: YAG a fim de estimular a proliferação de fibroblastos por meio da ativação de MAPK/ERK e relataram que não houve ativação de p38 e c-Jun N terminal pela LLLT.

6.5 Caracterização dos GRDs L4-L5 de ratos neuropáticos diabéticos submetidos à LLLT por espectroscopia Raman

Evidências de embasamento (*highlights*)

- Foram identificados picos característicos a partir de GRDs íntegros, em 2704 cm⁻¹, 2850 cm⁻¹, 2885 cm⁻¹, 2940 cm⁻¹, 3061 cm⁻¹ e 3160 cm⁻¹, relacionados a ligações CH₂/CH₃ simétricas e assimétricas, e vibrações C-H em lipídeos e proteínas;
- GRDs L4-L5 de ratos diabéticos hiperalgésicos apresentaram aumento significativo da intensidade dos picos 2704 cm⁻¹, 2850 cm⁻¹, 2885 cm⁻¹, e 3160 cm⁻¹;
- O tratamento com LLLT levou à redução da intensidade dos picos que apresentaram-se alterados, em paralelo ao efeito anti-hiperalgésico observado *in vivo*.

O espectro Raman se encontra na região que varia de ~500 cm⁻¹ a 1800 cm⁻¹, com maior energia de estiramento na região CH-OH, entre as bandas de absorção de ~2700 cm⁻¹ a 3300 cm⁻¹ que, juntas, compõe a identidade bioquímica da estrutura molecular e a composição das células e/ou tecidos (CAMP-Jr & CICERONE 2015). Para o nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho a caracterizar, por espectroscopia vibracional, os GRDs L4-L5 de ratos diabéticos neuropáticos. Em 2013, a caracterização do GRD controle foi realizada por Morisaki e colaboradores, a partir de gânglios em cultura. Da mesma forma, os autores caracterizaram o nervo isquiático a partir da representação da bainha de mielina e do axônio. As regiões de banda observadas, serviram de base para a primeira caracterização dos GRDs L4-L5 por espectroscopia Raman. Coincidentemente, os picos mais proeminentes foram observados nas mesmas regiões (2850 cm⁻¹; 2885 cm⁻¹; 2940 cm⁻¹) e, adicionalmente,

em 2074 cm^{-1} , 3061 cm^{-1} e 3160 cm^{-1} . Estas identidades espectrais foram utilizadas como referência para a caracterização completa dos GRDs de ratos diabéticos neuropáticos após o tratamento com LLLT.

Observamos que todas as regiões de banda estudadas, exceto em 3061 cm^{-1} , apresentaram aumento significativo de intensidade (em unidades arbitrárias, u. a.) no grupo STZ, em comparação aos demais grupos experimentais (Naïve; SCB; SCB+LLLT; STZ+LLLT). Ainda, a LLLT foi capaz de manter a intensidade dos picos em níveis similares aos dos grupos controle. A região estudada refere-se às ligações CH_2 e CH_3 típicas de lipídeo e proteína, encontradas em tecido nervoso periférico e corpos celulares de neurônios do GRD.

A correlação entre o espectro Raman e as mudanças na concentração proteica e nos níveis de mediadores inflamatórios sugerem que a espectroscopia Raman pode ser usada como um método *label-free*¹¹ para detectar alterações nos GRDs de ratos diabéticos neuropáticos, e confirma a gama de experimentos com foco sobre estas estruturas, tão importantes sob o ponto de vista farmacológico no tratamento da dor. Contudo, dada a escassez na literatura de estudos envolvendo o emprego do Raman na caracterização de material biológico oriundo do sistema nervoso, fica difícil concluir a abrangência de sua aplicação. A espectroscopia Raman tem sido utilizada em aplicações diversas no campo da biologia, principalmente na detecção de condições patológicas, uma vez que os espectros de células e tecidos “doentes” têm sido bem caracterizados e com forte reprodutibilidade (GNIADOCKA *et al.*, 2004; STUART, 2004; MOVASAGHI *et al.*, 2007; FUJITA & SMITH, 2008; DOWNES *et al.*, 2011; PULLY *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2018).

Os dados referentes à caracterização, por espectroscopia Raman, dos GRDs L4-L5 de ratos diabéticos hiperalgésicos submetidos à LLLT, compuseram o artigo científico “*Raman spectroscopy of dorsal root ganglia from streptozotocin-induced diabetic neuropathic rats submitted to photobiomodulation therapy*” (DOI: 10.1002/jbio.201900135), publicado na revista científica *Journal of Biophotonics* ©2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (disponível na seção de resultados, item 5.12.1), em que podem ser consultadas discussões adicionais sobre esta parte do estudo.

¹¹ Entende-se por *label-free* toda técnica laboratorial, especialmente na área de espectroscopia, que consegue realizar quantificações estruturais de moléculas sem a necessidade de marcadores fluorescentes, por exemplo. O sinal capturado é intrínseco à amostra, geralmente mantida o mais próximo possível da condição biológica.

6.6 Efeitos da aplicação da LLLT *in vitro*

Evidências de embasamento (*highlights*)

- A LLLT reduziu a responsividade dos neurônios do GRD, com base no influxo de cálcio, após o estímulo com concentrações incrementais de potássio (5, 15 e 50 mM);
- Neurônios do GRD mantidos em meio hiperglicêmico por 24 h e expostos à LLLT, apresentaram aumento do potencial de membrana neuronal (MMP), em tempo real;
- O aumento do MMP causado pela LLLT depende, parcialmente, da ativação dos complexos mitocondriais I e III;
- A LLLT não levou a alterações significativas do potencial de membrana neuronal, em tempo real;
- O laser infravermelho, 904 nm, 2,03 J, 29 s, aplicado diretamente sobre neurônios do GRD mantidos em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico, não promove morte neuronal;
- A aplicação diária da LLLT sobre as culturas neuronais, especialmente em meio hiperglicêmico, protege parcialmente os neurônios contra a apoptose.

A transmissão de um estímulo sensorial depende de vias sensoriais, a partir das terminações nervosas dos axônios, até os corpos celulares dos neurônios aferentes primários, localizados no GRD. Estes neurônios sensoriais são considerados os “*gatekeepers*” da informação sensorial (BASBAUM *et al.*, 2009; GONG *et al.*, 2016). Quando expostos à altas concentrações de glicose, como ocorre no diabetes, os neurônios aferentes primários podem ter sua função comprometida, levando à déficits no metabolismo e sobrevivência neuronal. Nesse sentido, o GRD é um importante alvo de estudo para a investigação de alterações no funcionamento dos neurônios sensoriais em diferentes condições associadas à dor crônica (ZHANG *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2011a; 2011b). Da mesma maneira, o GRD torna-se um importante alvo terapêutico, tanto para o teste de fármacos para o tratamento da dor, quanto para aplicação de terapias não farmacológicas, como é o caso da LLLT.

A habilidade dos fótons emitidos por um dispositivo laser ou LED, em modificar a atividade bioelétrica de neurônios sensoriais tem sido demonstrada em estudos envolvendo humanos e animais (CHOW *et al.*, 2007; YAN *et al.*, 2011). A supressão de potenciais de ação em nociceptores é um dos possíveis mecanismos que explicam os efeitos analgésicos da LLLT (CHOW *et al.*, 2011). Os nociceptores podem ser seletivamente afetados pela LLLT, e foi proposto que este efeito esteja subjacente aos efeitos da LLLT no tratamento da dor aguda e crônica (LIEBERT *et al.*, 2016), assim como da NDP. Entretanto, o exato mecanismo anti-hiperalgésico da LLLT na dor neuropática não foi totalmente compreendido (HSIEH *et al.*, 2012; HSIEH *et al.*, 2015; HOLANDA *et al.*, 2017). Um dos primeiros estudos

eletrofisiológicos sobre os efeitos da luz aplicada em nervos periféricos demonstrou que a irradiação com laser (490 nm) levou a inibição neural de neurônios do gânglio abdominal de moluscos marinhos *Aplysia Californica* (ARVANITAKI & CHALAZONITIS, 1961). No estudo de Chow e colaboradores (2007), a LLLT nos comprimentos de onda de 830, 808 e 650 nm, promoveu redução reversível do MMP de neurônios do GRD.

Os resultados do estudo da dinâmica de cálcio intracelular demonstram que a LLLT reduz a responsividade neuronal ao estímulo com alta concentração de potássio (KCl 50 mM). Tanto nos experimentos *ex vivo*, quanto nos experimentos *in vitro*, a exposição direta dos neurônios à LLLT reduziu o influxo de cálcio em comparação aos grupos controle. No meio hiperglicêmico a LLLT foi capaz de atenuar a responsividade dos neurônios do GRD durante pequenos incrementos na concentração de potássio extracelular (5 mM para 15 mM). Esta atenuação da resposta neuronal avaliada pelo influxo de cálcio pode ajudar na compreensão do efeito anti-hiperalgésico observado no estudo *in vivo*.

Existem poucos trabalhos que estudaram os efeitos da LLLT na dinâmica de cálcio intracelular. Yang e colaboradores (2007) demonstraram que após a irradiação de mastócitos com laser 532 nm, houve aumento na concentração intracelular de cálcio, levando a liberação de histamina. Este mecanismo da degranulação dos mastócitos está relacionado a ativação de canais TRPV4, uma vez que o bloqueio destes faz com que a ativação dos mastócitos pela LLLT seja interrompida, assim como a liberação de histamina. Por outro lado, Ryu *et al.* (2010) demonstraram que a irradiação com laser infravermelho reduziu a responsividade de neurônios ao estímulo com capsaicina por atenuação da atividade dos canais TRPV1. Em nosso estudo da dinâmica de cálcio, não distinguimos dentro da população de neurônios, quais os tipos mais responsivos ao estímulo com alta concentração de potássio extracelular.

Chow e colaboradores (2011) observaram que a irradiação com laser infravermelho (830 nm; 300 mW/cm²) induziu a formação de varicosidades axonais em neurônios do GRD de pequeno e médio diâmetro (que representam fibras do tipo C e Aδ, respectivamente), e que são relacionadas à dor, temperatura e tato leve. Em nosso estudo, a LLLT não reduziu a viabilidade celular dos neurônios expostos à irradiação em meio normoglicêmico. Ao aumentarmos a concentração de glicose do meio (55 mM) houve uma pequena queda na porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle, mas tal redução não se igualou ao controle de morte celular. Isso corrobora com o fato de que a formação de varicosidades axonais observadas em outros estudos, quando passageira, pode ajudar na atenuação do estímulo doloroso por prejudicar, ou dificultar a condução elétrica ao longo dos axônios.

De acordo com Chandrasekaran *et al.* (2015), a hiperglicemia leva ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na mitocôndria, e o excesso de EROs compromete o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons, especialmente a atividade dos complexos I e III, afetando a produção de ATP nos neurônios do GRD e, consequentemente, levando a um processo de degeneração do nervo periférico. Este processo afeta, ainda, o metabolismo das células de Schwann, gerando redução do MMP destas células, bem como nos neurônios do GRD (DELANEY *et al.*, 2001; VINCENT *et al.*, 2009). Com base nessas informações, nós investigamos se o efeito da LLLT sobre o MMP dependia da ativação dos complexos mitocondriais, que são afetados pelo meio hiperglicêmico.

Diferentemente de nossos resultados, Chow *et al.* (2007) observaram que o laser infravermelho (830 nm) induziu a formação de varicosidades axonais em neurônios do GRD de pequeno e médio diâmetro, e levou a uma redução significativa do MMP. Entretanto, os autores não avaliaram a influência da hiperglicemia do meio sobre o MMP dos neurônios aferentes primários do GRD. Além do MMP, outros estudos investigaram a inibição de componentes lentos de potenciais de ação, causados pela LLLT (TSUCHIYA *et al.*, 1993; TSUCHIYA *et al.*, 1994). Tal inibição dos potenciais de ação pela LLLT pode ser útil para o tratamento da NDP e da dor crônica no geral. Baseado nisso, investigamos os efeitos da LLLT sobre o potencial de membrana neuronal de neurônios do GRD mantidos por 24 h em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico. A princípio utilizamos um corante fluorescente (FluoVolt™), sensível às alterações de voltagem da membrana celular, e foi observada redução sutil (*ultra fast-term response*) após a aplicação da LLLT. Para confirmar o possível efeito hiperpolarizante da LLLT sobre o potencial de membrana neuronal, utilizamos a técnica de patch clamp *whole-cell*.

A técnica de patch clamp é uma poderosa ferramenta empregada no estudo da atividade dos canais elétricos e receptores de membrana, e um grande número de estudos tem aplicado esta técnica em neurônios do GRD (ZHANG *et al.*, 1999; DIB-HAJJ *et al.*, 1999; CUMMINS *et al.*, 1999). Entretanto, confirmando o que foi observado na análise do potencial de membrana neuronal, com base na fluorescência, não observamos efeitos da LLLT sobre o potencial de repouso da membrana neuronal. Em ambos os meios de cultura, normoglicêmico ou hiperglicêmico, a LLLT não reduziu a amplitude e/ou dificultou a deflagração de potenciais de ação. Acreditamos que tal efeito, possivelmente, tenha relação com os parâmetros de irradiação utilizados para a LLLT em nosso estudo, uma vez que diferentes doses de energia produzem diferentes respostas biológicas.

6.7 Considerações finais

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, sugerimos que a indução do diabetes tipo I por múltiplas doses de STZ é eficaz como modelo para o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica, pois representa melhor a destruição gradual das células β -pancreáticas e a consequente falha na produção de insulina, levando a hiperglicemia irreversível, assim como ocorre em humanos. A aplicação da LLLT durante o desenvolvimento da dor neuropática diabética pode ser uma ferramenta terapêutica que ajuda a prevenir, parcialmente, a gravidade da hiperalgesia. Da mesma forma, a LLLT (904 nm; 2,03 J; 70 mW; 29 s) apresentou efeito anti-hiperalgésico quando o tratamento é realizado após a instalação da dor neuropática diabética e, esse efeito benéfico, não depende de possíveis efeitos sistêmicos ou metabólicos da terapia, uma vez que os animais continuaram com as alterações metabólicas típicas do T1D.

Foi possível identificar alterações na função motora dinâmica dos animais diabéticos neuropáticos após 14 dias do início das injeções de STZ e algumas destas alterações demonstraram forte correlação com o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica. Em paralelo, o tratamento com LLLT foi capaz de amenizar e/ou reestabelecer o padrão de marcha mais próximo do normal, em animais diabéticos neuropáticos. A LLLT, ainda, reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) e a expressão gênica e proteica de p38 nos GRDs de ratos diabéticos neuropáticos. Também, foram observados efeitos positivos sobre alterações espectrais, identificadas a partir de GRDs de ratos diabéticos hiperalgésicos. A LLLT, por meio de uma *long-term response*, reduziu a responsividade de neurônios em cultura, com base no menor influxo de cálcio durante estímulo com alto potássio no meio extracelular. Em meio hiperglicêmico, a LLLT foi capaz de reduzir a responsividade neuronal à estímulos com menores concentrações de potássio, concentrações estas já suficientes para gerar aumento do influxo de cálcio em neurônios expostos à hiperglicemia do meio. A LLLT também apresentou efeito direto sobre o MMP em neurônios do GRD mantidos em meio hiperglicêmico. O aumento do MMP, por meio de uma *fast-term response*, foi dependente da ativação de complexos mitocondriais, corroborando com estudos sobre os mecanismos de interação da luz com cromóforos teciduais e o CCO como principal fotorreceptor celular.

A dor crônica é um grande problema de saúde em todo o mundo. Estima-se que pode afetar cerca de 20 % da população em países desenvolvidos e resulta de plasticidade neural

oriunda de sensibilização periférica e central. Nos últimos anos, surgiram vários trabalhos examinando como as vias de sinalização das MAPKs poderiam regular a hipersensibilidade à dor em diferentes condições patológicas. Como as MAPKs são diferencialmente ativadas em neurônios e glia (microglia e astrócitos) sob condições de dor inflamatória e neuropática, as pMAPKs podem ser usadas como marcadores moleculares e celulares para se testar a eficácia e os mecanismos de novos analgésicos e mesmo de terapias não farmacológicas. A vantagem do uso destas refere-se à ausência de efeitos colaterais e menor custo financeiro, como a LLLT, com foco no GRD, uma vez que o tratamento com LLLT foi capaz de reduzir a expressão de p38, fato este que está relacionado à redução da dor neuropática diabética em ratos submetidos às múltiplas injeções de STZ.

Dada a carência de estudos que investigassem detalhadamente os efeitos da LLLT sobre a condição da dor neuropática diabética, este trabalho possui forte importância clínica e terapêutica. Após completo entendimento do modelo estudado e dos mecanismos pelos quais a LLLT promove a anti-hiperalgesia, o próximo passo seria um estudo epidemiológico, verificando a prevalência da neuropatia diabética nos serviços públicos de saúde, bem como um estudo randomizado, placebo, duplo-cego e controlado sobre os efeitos benéficos da aplicação da LLLT nesta população de indivíduos que apresentam sintomas de dor neuropática decorrente do diabetes.

7 CONCLUSÕES

De maneira geral, a LLLT apresentou efeito benéfico no tratamento da neuropatia diabética periférica experimental, pois foi capaz de atuar positivamente sobre as principais alterações comportamentais, celulares, moleculares e espectrais dessa condição patológica. O efeito anti-hiperalgésico do infravermelho pode ser um importante aliado na clínica para o tratamento de neuropatias crônicas e beneficiar uma grande parcela da população que sofre de tais agravos à saúde.



REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, T.; GUPTA, G. K.; RAI, V.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. Pre-conditioning with low-level laser (light) therapy: light before the storm. **Dose Response**. v. 12, p. 619-649, 2014.
- AHLGREN, S. C.; LEVINE, J. D. Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats is not sympathetically maintained. **Brain Res**. v. 616, n. 1-2, p. 171-175, 1993.
- AKKINA, S. K., PATTERSON, C. L. & WRIGHT, D. E. GDNF Rescues Nonpeptidergic Unmyelinated Primary Afferents in Streptozotocin-Treated Diabetic Mice. **Exp Neurol**. v. 167, p. 173-182, 2001.
- AKUDE, E.; ZHEREBITSKAYA, E.; CHOWDHURY, S. K.; SMITH, D. R.; DOBROWSKY, R. T.; FERNYHOUGH, P. Diminished superoxide generation is associated with respiratory chain dysfunction and changes in the mitochondrial proteome of sensory neurons from diabetic rats. **Diabetes**. v. 60, n. 1, p. 288-297, 2011.
- ALCÂNTARA, C.C.; GIGO-BENATO, D.; SALVINI, T. F.; OLIVEIRA, A. L.; ANDERS, J. J.; RUSSO T. L. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute neural recovery and inflammation-related gene expression after crush injury in rat sciatic nerve. **Lasers Surg Med**. v. 45, n. 4, p. 246-252, 2013.
- ALEKSIC, V.; AOKI, A.; IWASAKI, K.; TAKASAKI, A. A.; WANG, C. Y.; ABIKO, Y.; ISHIKAWA, I.; IZUMI, Y. Low-level Er: YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. **Lasers Med Sci**. v. 25, p. 559-569, 2010.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Introduction: standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**. v. 43, n. 1, pS1-S1, 2020.
- ANDERS, J. J.; LANZAFAME, R. J.; ARANY, P. R. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. **Photomed Laser Surg**. v. 33, n. 4, p. 183-184, 2015.

ÄNGEBY-MÖLLER, K.; KINERT, S.; STØRKSON, R.; BERGE, O. G. Gait analysis in rats with single joint inflammation: influence of experimental factors. **PLoS One**. v. 7, 2012.

ARVANITAKI, A.; CHALAZONITIS, N. Excitatory and inhibitory processes initiated by light and infra-red radiations in single identifiable nerve cells (giant nerve cells of *Aplysia*). **Nervous Inhibition** (Edited by FLOREY E.), p. 194-231. Pergamon Press, Oxford, 1961.

ATHIÉ, M. C. P.; VIEIRA, A. S.; TEIXEIRA, J. M.; SANTOS, G. G.; DIAS, E. V.; TAMBELI, C. H.; SARTORI, C. R.; PARADA, C. A. Transcriptome analysis of dorsal root ganglia's diabetic neuropathy reveals mechanisms involved in pain and regeneration. **Life Sci**. v. 205, p. 54-62, 2018.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. v. 139, p. 267-284, 2009.

BEAUVOIT, B.; KITAI, T; CHANCE, B. Contribution of the mitochondrial compartment to the optical properties of the rat liver: a theoretical and practical approach. **Biophys J**. v. 67, p. 2501-2510, 1994

BENITEZ, S. U.; CARNEIRO, E. M.; DE OLIVEIRA, A. L. R. Synaptic input changes to spinal cord motoneurons correlate with motor control impairments in a type 1 diabetes mellitus model. **Brain Behav**. v. 5, p. 1-9, 2015.

BJORDAL, J. M.; COUPPE, C.; CHOW, R. T.; TUNER, J.; LJUNGGREN, E. A. A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. **Aust J Physiother**. v. 49, p. 107-116, 2003.

BLOEMBERGEN, N.; PERSHAN, P. S. Light waves at the boundary of nonlinear media. **Physical Review**. v. 128, n. 2, p. 606-622, 1962.

BONNY, C.; BORSELLO, T.; ZINE, A. Targeting the JNK pathway as a therapeutic protective strategy for nervous system diseases. **Rev Neurosci**. v. 16, p. 57-67, 2005.

BOULTON, A. J. Diabetic neuropathy: is pain God's greatest gift to mankind? **Semin Vasc Surg.** v 25, n. 2, p. 61-65, 2012.

BOYLE, D. L.; JONES, T. L.; HAMMAKER, D.; SVENSSON, C. I.; ROSENGREN, S.; ALBANI, S.; SORKIN, L.; FIRESTEIN, G. S. Regulation of peripheral inflammation by spinal p38 MAP kinase in rats. **PLoS Med.** v. 3, n. 9, p. e338, 2006.

BOZKURT, A.; DEUMENS, R.; SCHEFFEL, J.; O'DEY, D. M.; WEIS, J.; JOOSTEN, E. A.; FUHRMANN, T.; BROOK, G. A.; PALLUA, N. CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury. **J Neurosci Methods.** v. 173, n. 1, p. 91-98, 2008.

BOZKURT, A.; SCHEFFEL, J.; BROOK, G. A.; JOOSTEN, E. A.; SUSCHEK, C. V.; O'DEY, D. M.; PALLUA, N.; DEUMENS, R. Aspects of static and dynamic motor function in peripheral nerve regeneration: SSI and CatWalk gait analysis. **Behav Brain Res.** v. 219, n.1, p. 55-62, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature.** v. 414, p. 813-820, 2001.

BYRNES, K. R.; WAYNANT, R. W.; ILEV, I. K.; WU, X.; BARNA, L.; SMITH, K.; HECKERT, R.; GERST, H.; ANDERS, J. J. Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury. **Lasers Surg Med.** v. 36, n. 3, p. 171-185, 2005a.

BYRNES, K. R.; WU, X.; WAYNANT, R. W.; ILEV, I. K.; ANDERS, J. J. Low power laser irradiation alters gene expression of olfactory ensheathing cells in vitro. **Lasers Surg Med.** v. 37, p. 161-171, 2005b.

CALLAGHAN, B. C.; CHENG, H. T.; STABLES, C. L.; SMITH, A. L.; FELDMAN, E. L. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. **Lancet Neurol.** v. 11, n. 6, p. 521-534, 2012.

CAMP-Jr, C. H.; CICERONE, M. T. Chemically sensitive bioimaging with coherent Raman scattering. **Nat Photonics.** v. 9, p. 295-305, 2015.

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

CARROLL, J. D.; MILWARD, M. R.; COOPER, P. R.; HADIS, M.; PALIN, W. M. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. **Dent Mater.** v. 30, n. 5, p. 465-475, 2014.

CHAN, A.; ARMATI, P.; MOORTHY, A. P. Pulsed Nd: YAG Laser induces pulpal analgesia: a randomized clinical trial. **J Dent Res.** v. 91, p. S79-S84, 2012.

CHANDRASEKARAN, K.; ANJANEYULU, M.; INOUE, T.; CHOI, J.; SAGI, A. R.; CHEN, C.; IDE, T.; RUSSELL, J. W. Mitochondrial transcription factor A regulation of mitochondrial degeneration in experimental diabetic neuropathy. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 309, n. 2, p. 132-141, 2015.

CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. **Nature.** v. 410, p. 37-40, 2001.

CHENG, H. L.; FELDMAN, E. L. Bidirectional regulation of p38 kinase and c-Jun N-terminal protein kinase by insulin-like growth factor-I. **J Biol Chem.** v. 273, p. 14560-14565, 1998.

CHOW, R. T.; ARMATI, P.; LAAKSO, E. L.; BJORDAL, J. M.; BAXTER, G. D. Inhibitory effects of laser irradiation on peripheral mammalian nerves and relevance to analgesic effects: a systematic review. **Photomed Laser Surg.** v. 29, p. 365-381, 2011.

CHOW, R. T.; BARNSELEY, L. Systematic review of the literature of low-level laser therapy (LLLT) in the management of neck pain. **Lasers Surg Med.** v. 37, n. 1, p. 46-52, 2005.

CHOW, R. T.; DAVID, M. A.; ARMATI, P. J. 830 nm laser irradiation induces varicosity formation, reduces mitochondrial membrane potential and blocks fast axonal flow in small and medium diameter rat dorsal root ganglion neurons: implications for the analgesic effects of 830 nm laser. **J Peripher Nerv Syst.** v. 12, p. 28-39, 2007.

CHOW, R. T.; JOHNSON, M. I.; LOPES-MARTINS, R. A.; BJORDAL, J. M. Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: A systematic review and meta-analysis of randomized placebo or active-treatment controlled trials. **Lancet.** v. 374, n. 9705, p. 1897-1908, 2009.

CHOWDHURY, S. K.; DOBROWSKY, R. T.; FERNYHOUGH, P. Nutrient excess and altered mitochondrial proteome and function contribute to neurodegeneration in diabetes. **Mitochondrion.** v. 11, n. 6, p. 845-854, 2011.

CHRISTIANSON, J. A.; RIEKHOF, J. T.; WRIGHT, D. E. Restorative effects of neurotrophin treatment on diabetes-induced cutaneous axon loss in mice. **Exp Neurol.** v. 179, p. 188-199, 2003.

CHRISTIE, A.; JAMTVEDT, G.; DAHM, K. T.; MOE, R. H.; HAAVARDSHOLM, E.; HAGEN, K. B. Effectiveness of nonpharmacological and nonsurgical interventions for patients with rheumatoid arthritis: an overview of systematic reviews. **Phys Ther.** v. 87, p. 1697-1715, 2007.

CHUNG, H.; DAI, T.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y-Y.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Ann Biomed Eng.** v. 40, n. 2, p. 516-533, 2011.

CIDRAL-FILHO, F. J.; MARTINS, D. F.; MORE, A. O.; MAZZARDO-MARTINS, L.; SILVA, M. D.; CARGNIN-FERREIRA, E.; SANTOS, A. R. Light-emitting diode therapy

induces analgesia and decreases spinal cord and sciatic nerve tumour necrosis factor-alpha levels after sciatic nerve crush in mice. **Eur J Pain**. v. 17, n. 8, p. 1193-1204, 2013.

CIRUELA, A.; DIXON, A. K.; BRAMWELL, S.; GONZALEZ, M. I.; PINNOCK, R. D.; LEE, K. Identification of MEK1 as a novel target for the treatment of neuropathic pain. **Br J Pharmacol**. v. 138, p. 751-756, 2003.

CONTI, G.; SCARPINI, E.; BARON, P.; LIVRAGHI, S.; TIRITICCO, M.; BIANCHI, R.; VEDELER, C.; SCARLATO, G. Macrophage infiltration and death in the nerve during the early phases of experimental diabetic neuropathy: a process concomitant with endoneurial induction of IL-1beta and p75NTR. **J Neurol Sci**. v. 195, p. 35-40, 2002.

COURTEIX, C.; ESCHALIER, A.; LAVARENNE, J. Streptozotocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. **Pain**. v. 53, n. 1, p. 81-88, 1993.

CUMMINS, T. R.; DIB-HAJJ, S. D.; BLACK, J. A.; AKOPIAN, A. N.; WOOD, J. N.; WAXMAN, S. G. A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in SNS-null and wild-type small primary sensory neurons. **J Neurosci**. v. 19, n. 24, p. RC43, 1999.

DABELEA, D.; BELL, R. A.; D'AGOSTINO Jr, R. B.; IMPERATORE, G.; JOHANSEN, J. M.; LINDER, B.; LIU, L. L.; LOOTS, B.; MARCOVINA, S.; MAYER-DAVIS, E. J.; PETTITT, D. J.; WAITZFELDER, B. Incidence of diabetes in youth in the United States. **JAMA**. v. 297, n. 24, p. 2716-2724, 2007.

DAULHAC, L.; MALLET, C.; COURTEIX, C.; ETIENNE, M.; DUROUX, E.; PRIVAT, A. M.; ESCHALIER, A.; FIALIP, J. Diabetes-induced mechanical hyperalgesia involves spinal mitogen-activated protein kinase activation in neurons and microglia via N-methyl-D-aspartate-dependent mechanisms. **Mol Pharmacol**. v. 70, p. 1246-1254, 2006.

DeFREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. **IEEE J Sel Top Quantum Electron**. v. 22, n. 3, p. 7000417, 2016.

DeFRONZO, R. A., FERRANNINI, E., ZIMMET, P., ALBERTI, G. International Textbook of Diabetes Mellitus, 2 Volume Set, 4th Edition. Wiley-Blackwell, 2015.

DELANEY, C. L.; RUSSELL, J. W.; CHENG, H. L.; FELDMAN, E. L. Insulin-like growth factor-I and over-expression of Bcl-xL prevent glucose-mediated apoptosis in Schwann cells. **J Neuropathol Exp Neurol.** v. 60, p. 147-160, 2001.

DIB-HAJJ, S. D.; FJELL, J.; CUMMINS, T. R.; ZHENG, Z.; FRIED, K.; LAMOTTE, R.; BLACK, J. A.; WAXMAN, S. G. Plasticity of sodium channel expression in DRG neurons in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. **Pain.** v. 83, p. 591-600, 1999.

Do PRADO, F. C.; VIEIRA, W. F.; MAGALHÃES, S. F.; BONET, I. J.; TAMBELI, C. H.; PARADA, C. A. The onset speed of hyperglycemia is important to the development of neuropathic hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats. **E J Neurosci.** v. 00, p. 1-10, 2020;

DOWNES, A.; MOURAS, R.; BAGNANINCHI, P.; ELFICK, A. Raman spectroscopy and CARS microscopy of stem cells and their derivatives. **J Raman Spectrosc.** v. 42, n. 10, p. 1864–1870, 2011.

DU, Y.; TANG, J.; LI, G.; BERTI-MATTERA, L.; LEE, C. A.; BARTKOWSKI, D.; GALE, D.; MONAHAN, J.; NIESMAN, M. R.; ALTON, G.; KERN, T. S. Effects of p38 MAPK inhibition on early stages of diabetic retinopathy and sensory nerve function. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v. 51, p. 2158–2164, 2010.

EDWARDS, J. L.; VINCENT, A. M.; CHENG, H. T.; FELDMAN, E. L. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. **Pharmacol Ther.** v. 120, p. 1-34, 2008.

ENGLISH, J.; PEARSON, G.; WILSBACHER, J.; SWANTEK, J.; KARANDIKAR, M.; XU, S.; COBB, M. H. New insights into the control of MAP kinase pathways. **Exp Cell Res.** v. 253, p. 255–270, 1999.

FAN, N.; DONNELLY, D. F.; LAMOTTE, R. H. Chronic compression of mouse dorsal root ganglion alters voltage-gated sodium and potassium currents in medium-sized dorsal root ganglion neurons. **J Neurophysiol.** v. 106, p. 3067-3072, 2011;

FAN, N.; SIKAND, P.; DONNELLY, D. F.; MA, C.; LAMOTTE, R. H. Increased Na⁺ and K⁺ currents in small mouse dorsal root ganglion neurons after ganglion compression. **J Neurophysiol.** v. 106, p. 211-218, 2011;

FELDMAN, E. L.; BENNETT, D. L. H.; NAVE, K-A.; JENSEN, T. S. New horizons in diabetic neuropathy: mechanisms, bioenergetics, and pain. **Neuron.** v. 93, n. 6:1296-1313, 2017.

FERNANDES, K. P.; ALVES, A. N.; NUNES, F. D.; SOUZA, N. H.; SILVA, J. A. JR., BUSSADORI, S. K.; FERRARI, R. A. Effect of photobiomodulation on expression of IL-1beta in skeletal muscle following acute injury. **Lasers Med Sci.** v. 28, n. 3, p. 1043–1046, 2013.

FERNYHOUGH, P.; CALCUTT, N. A. Abnormal calcium homeostasis in peripheral neuropathies. **Cell Calcium.** v. 47, n. 2, p. 130-139, 2010.

FUJITA, K.; SMITH, N. I. Label-free molecular imaging of living cells. **Mol Cells.** v. 26, n. 6, p. 530–535, 2008.

FURMAN, B. L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. **Curr Protoc Pharmacol.** v. 70, p. 1-5, 2015.

GABRIEL, A. F.; MARCUS, M. A. E.; HONIG, W. M. M.; WALENKAMP, G. M.; JOOSTEN, E. J. The CatWalk method: A detailed analysis of behavioral changes after acute inflammatory pain in the rat. **J Neurosci Methods.** v. 163, p. 9-16, 2007.

GALAN, A.; CERVERO, F.; LAIRD, J. M. Extracellular signaling-regulated kinase-1 and -2 (ERK 1/2) mediate referred hyperalgesia in a murine model of visceral pain. **Brain Res Mol Brain Res.** v. 116, p. 126-134, 2003.

GALLOWAY, C.; CHATTOPADHYAY, M. Increases in inflammatory mediators in DRG implicate in the pathogenesis of painful neuropathy in type 2 diabetes. **Cytokine**. v. 63, n. 1, p. 1-5, 2013.

GANDHI, R. A.; SELVARAJAH, D. Understanding and treating painful diabetic neuropathy: time for a paradigm shift. **Diabet Med**. v. 32, p. 771-777, 2015.

GAVRIELA, S.; URI, O.; ANDREY, I.; ANTON, W.; HALEVY, H. O. Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway. **J Cell Physiol**. v. 187, p. 73-80, 2001.

GIGO-BENATO, D.; GEUNA, S.; ROCHKIND, S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. **Muscle Nerve**. v. 31, p. 694-701, 2005.

GNIADECKA, M.; PHILIPSEN, P. A.; SIGURDSSON, S.; WESSEL, S.; NIELSEN, O. F.; CHRISTENSEN, D. H.; HERCOGOVA, J.; ROSSEN, K.; THOMSEN, H. K.; GNIADECKI, R.; HANSEN, L. K.; WULF, H. C. Melanoma diagnosis by Raman spectroscopy and neural networks: structure alterations in proteins and lipids in intact cancer tissue. **J Invest Dermatol**. v. 122, n. 2, p. 443-449, 2004.

GONÇALVES, N. P.; VÆGTER, C. B.; PALLESEN, L. T. Peripheral glial cells in the development of diabetic neuropathy. **Frontiers in Neurology**. v. 9, p. 1-9, 2018.

GONG, K.; OHARA, P. T.; JASMIN, J. Patch clamp recordings of intact dorsal root ganglia from adult rats. **J Vis Exp**. v. 115, p. 09-29, 2016.

GREENE, D. A.; STEVENS, M. J.; OBROSOVA, I.; FELDMAN, E. L. Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. **Eur J Pharmacol**. v. 375, n. 1-3, p. 217-223, 1999.

GREGG, E. W.; SORLIE, P.; PAULOSE-RAM, R.; GU, Q.; EBERHARDT, M. S.; WOLZ, M.; BURT, V.; CURTIN, L.; ENGELGAU, M.; GEISS, L. Prevalence of lower-extremity

disease in the US adult population ≥ 40 years of age with and without diabetes: 1999–2000 national health and nutrition examination survey. **Diabetes Care**. v. 27, p. 1591-1597, 2004.

GUTKIND, J. S. Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. **Sci STKE**. v. 40, p. 1, 2000.

HAMBLIN, M. R. Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation. **Photochem Photobiol**. v. 94, p. 199-212.

HARRIS, K.; BOLAND, C.; MEADE, L.; BATTISE, D. Adjunctive therapy for glucose control in patients with type 1 diabetes. **Diabetes Metab Syndr Obes**. v. 11, p. 159–173, 2018.

HOLANDA, V. M.; CHAVANTES, M. C.; SILVA, D. F.; DE HOLANDA, C. V.; DE OLIVEIRA, J. O. Jr.; WU, X.; ANDERS, J. J. Photobiomodulation of the dorsal root ganglion for the treatment of low back pain: A pilot study. **Lasers Surg Med**. v. 48, n. 7, p. 653-659, 2016.

HOLANDA, V. M.; CHAVANTES, M. C.; WU, X.; ANDERS, J. J. The mechanistic basis for photobiomodulation therapy of neuropathic pain by near infrared laser light. **Lasers Surg Med**. v. 49, p. 516-524, 2017.

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

HSIEH, Y. L.; FAN, Y. C.; YANG, C. C. Low-level laser therapy alleviates mechanical and cold allodynia induced by oxaliplatin administration in rats. **Support Care Cancer**. v. 24, n. 1, p. 233-242, 2015.

HUANG, C. K.; ANDO, M.; HAMAGUCHI, H. O.; SHIGETO, S. Disentangling dynamic changes of multiple cellular components during the yeast cell cycle by in vivo multivariate Raman imaging. **Anal Chem.** v. 84, n. 13, p. 5661-5668, 2012.

HUANG, Y. Y.; CHEN, A. C.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response.** v. 7, p. 358-383, 2009.

HUANG, Y. Y.; SHARMA, S. K.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. Biphasic dose response in low level light therapy – an update. **Dose Response.** v. 9, p. 602-618, 2011.

HUEHNCHEN, P.; BOEHMERLE, W.; ENDRES, M. Assessment of Paclitaxel Induced Sensory Polyneuropathy with ‘Catwalk’ Automated Gait Analysis in Mice. **PLoS One.** v. 8, n. 10, p. e76772, 2013.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas, 9th edition, Brussels, Belgium: **International Diabetes Federation**, 2019.

IRVINE, R. F.; SCHELL, M. J. Back in the water: the return of the inositol phosphates. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 2, n. 5, p. 327-338, 2001.

ISHII, D. N. Insulin and related neurotrophic factors in diabetic neuropathy. **Diabet Med.** v. 10, n. 2, p. 14S-15S, 1993.

JAMTVEDT, G.; DAHM, K. T.; CHRISTIE, A.; MOE, R. H.; HAAVARDSHOLM, E.; HOLM, I.; HAGEN, K. B. Physical therapy interventions for patients with osteoarthritis of the knee: an overview of systematic reviews. **Phys Ther.** v. 88, p. 123-136, 2008.

JENSEN, T. S.; FINNERUP, N. B. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. **The Lancet Neurology.** v. 13, n. 9, p. 924-935, 2014.

JJ, R. R.; GEREAU, R. W.; MALCANGIO, M.; STRICHARTZ, G. R. MAP kinase and pain. **Brain Res Rev.** v. 60, n. 1, p. 135-148, 2009.

JI, R. R.; SAMAD, T. A.; JIN, S. X.; SCHMOLL, R.; WOOLF, C. J. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. **Neuron**. v. 36, p. 57-68, 2002.

JIN, S. X.; ZHUANG, Z. Y.; WOOLF, C. J.; JI, R. R. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. **J Neurosci**. v. 23, p. 4017-4022, 2003.

JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**. v. 298, p. 1911-1912, 2002.

JURANEK, J. K.; GEDDIS, M. S.; SONG, F.; ZHANG, J.; GARCIA, J.; ROSARIO, R.; YAN, S. F.; BRANNAGAN, T. H.; SCHMIDT, A. M. RAGE deficiency improves postinjury sciatic nerve regeneration in type 1 diabetic mice. **Diabetes**. v. 62, p. 931-943, 2013.

KAMBIZ, S.; VAN NECK, J. W.; COSGUN, S. G.; VAN VELZEN, M. H.; JANSSEN, J. A.; AVAZVERDI, N.; HOVIUS, S. E.; WALBEEHM, E. T. An early diagnostic tool for diabetic peripheral neuropathy in rats. **PLoS One**. v. 10, n. 5, p. 1-15, 2015.

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

KARU, T. I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near- IR radiation. **Photochem Photobiol**. v. 84, n. 5, p. 1091-1099, 2008.

KARU, T. I.; KOLYAKOV, S. F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. **Photomed Laser Surg**. v. 23, p. 355-361, 2005.

KENNEY, A. M.; KOCSIS, J. D. Peripheral axotomy induces long-term c-Jun amino-terminal kinase-1 activation and activator protein-1 binding activity by c-Jun and junD in adult rat dorsal root ganglia in vivo. **J Neurosci**. v. 18, p. 1318-1328, 1998.

KOLB, H. Mouse models of insulin dependent diabetes: Low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. **Diabetes Metab Rev.** v. 3, p. 751-778, 1987.

KOLB-BACHOFEN, V.; EPSTEIN, S.; KIESEL, U.; KOLB, H. Low-dose streptozocin-induced diabetes in mice. Electron microscopy reveals single-cell insulitis before diabetes onset. **Diabetes.** v. 37, p. 21-27, 1988.

KONO, T.; KASAI, S.; SAKAMOTO, T.; MITO, M. Cord dorsum potentials suppressed by low power laser irradiation on a peripheral nerve in the cat. **J Clin Laser Med Surg.** v. 11, n. 3, p. 115-118, 1993.

KOYA, D.; JIROUSEK, M. R.; LIN, Y-M.; ISHII, H.; KUBOKI, K.; KING, G. L. Characterization of protein Kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli rats. **J Clin Invest.** v. 100, p. 100-126, 1997.

KRISHNA, M.; NARANG, H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. **Cell Mol Life Sci.** v. 65, p. 3525-3544, 2008.

KUMAR, A.; SHARMA, S. S. NF-kappaB inhibitory action of resveratrol: a probable mechanism of neuroprotection in experimental diabetic neuropathy. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 394, p. 360-365, 2010.

KUMAR, S.; BOEHM, J.; LEE, J. C. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. **Nat Rev Drug Discov.** v. 2, p. 717-726, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANE, N. Cell biology: power games. **Nature.** v. 443, p. 901-903, 2006.

LEE, A. Y. M.; CHUNG, S. S. M. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. **FASEB.** v. 13, n. 1, p. 23-30, 1999.

LEE, J.; PILCH, P. F. The insulin receptor: structure, function, and signaling. **Am J Physiol Cell Physiol.** v. 266, n. 2, p. 319-334, 1994.

LIEBERT, A. D.; CHOW, R. T.; BICKNELL, B. T.; VARIGOS, E. Neuroprotective effects against POCD by photobiomodulation: evidence from assembly/disassembly of the cytoskeleton. **J Exp Neurosci.** v. 10, p. 1-19, 2016;

LIESE, A. D.; D'AGOSTINO, R. B. JR.; HAMMAN, R. F. The burden of diabetes mellitus among US youth: prevalence estimates from the SEARCH for diabetes in youth study. **Pediatrics.** v. 118, n. 4, p. 1510-1518, 2006.

LIKE, A. A.; ROSSINI, A. A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: New model of diabetes mellitus. **Science.** v. 193, p. 415-417, 1976.

LINHART, O.; OBREJA, O.; KRESS, M. The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin E2 and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons. **Neuroscience.** v. 118, p. 69-74, 2003.

LONGO, L. The role of laser in diabetes management. Waynant R, Tata DB, eds. Proceedings of Light-Activated Tissue Regeneration and Therapy Conference. London: Springer 2008. **Lecture Notes in Electrical Engineering.** v. 12, n. 6, p. 215-220, 2008.

MA, W.; QUIRION, R. Partial sciatic nerve ligation induces increase in the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in astrocytes in the lumbar spinal dorsal horn and the gracile nucleus. **Pain.** v. 99, p. 175-184, 2002.

MAAHS, D. M.; WEST, N. A.; LAWRENCE, J. M.; MAYER-DAVIS, E. J. Epidemiology of type 1 diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am.** v. 39, n. 3, p. 481-497, 2010.

MAEDA, T. Morphological demonstration of low reactive laser therapeutic pain attenuation effect of the gallium aluminium arsenide diode laser. **Laser Ther.** v. 1, p. 23-30, 1989.

MANNING, A. M.; DAVIS, R. J. Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? **Nat Rev Drug Discov.** v. 2, p. 554-565, 2003.

MANZO, L. P.; CERAGIOLI, H. J.; BONET, I. J.; NISHIJIMA, C. M.; VIEIRA, W. F.; OLIVEIRA, E. C.; DESTRO-FILHO, J. B.; SARTORI, C. R.; TAMBELI, C. H.; PARADA, C. A. Magnetic, but not non-magnetic, reduced graphene oxide in spinal cord increases nociceptive neuronal responsiveness. **Nanomedicine.** v. 13, n. 5, p. 1841-1851, 2017.

MARKOVIĆ, A. B.; TODOROVIĆ, L. Postoperative analgesia after lower third molar surgery: contribution of the use of long-acting local anesthetics, low-power laser, and diclofenac. **Oral Surgery Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.** v. 102, n. 5, p. 4-8, 2006.

MCCARBERG, B. H.; BILLINGTON, R. Consequences of neuropathic pain: quality-of-life issues and associated costs. **American Journal of Management Care.** v. 12, p. S263-S268, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Sistema de informações sobre orçamentos públicos em saúde (SIOPS). Minuta de Análise dos Gastos da União em Ações e Serviços Públicos de Saúde, no período 2000 a 2010.** Documento elaborado por subgrupo da Câmara Técnica do SIOPS, Brasília, outubro 2011, mimeo.

MÖLLER, K. A.; BERGE, O. G.; HAMERS, F. P. T. Using the CatWalk method to assess weight-bearing and pain behaviour in walking rats with ankle joint monoarthritis induced by carrageenan: Effects of morphine and rofecoxib. **J Neurosci Methods.** v. 174, p. 1-9, 2008.

MÖLLER, K. A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O. G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **J Neurosci Methods.** v. 84, p. 41-47, 1998.

MORISAKI, S.; OTA, C.; MATSUDA, K.; KAKU, N.; FUJIWARA, H.; ODA, R.; ISHIBASHI, H.; KUBO, T.; KAWATA, M. Application of Raman spectroscopy for

visualizing biochemical changes during peripheral nerve injury in vitro and in vivo. **J Biomed Opt.** v. 18, n. 11, p. 116011, 2013.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Raman spectroscopy of biological tissues. **Appl Spectrosc Rev.** v. 42, p. 493-541, 2007.

O'CONNOR, A.; DWORKIN, R. H. Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. **Am J Med.** v. 122, n. 10, p. 22-32, 2009.

PASSARELLA, S.; KARU, T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photo- acceptors results in photobiomodulation. **J Photochem Photobiol B Biol.** v. 140, p. 344-358, 2014.

PASTORE, D.; GRECO, M.; PASSARELLA, S. Specific helium-neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase. **Int J Radiat Biol.** v. 76, p. 863-870, 2000.

PEPLOW, P. V.; CHUNG, T. Y.; BAXTER, G. D. Laser photostimulation (660 nm) of wound healing in diabetic mice is not brought about by ameliorating diabetes. **Lasers Surg Med.** v. 44, p. 26-29, 2012.

PEPLOW, P. V.; CHUNG, T. Y.; RYAN, B.; BAXTER, G. D. Laser photo-biomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: A review of human and animal studies. **Photomed Laser Surg.** v. 29, n. 5, p. 285-304, 2011.

PERES E SERRA, A.; ASHMAWI, H. Influence of naloxone and methysergide on the analgesic effects of low-level laser in an experimental pain model. **Rev Bras Anesthesiol.** v. 60, n. 3, p. 302-310, 2010.

PIAO, Z. G.; CHO, I. H.; PARK, C. K.; HONG, J. P.; CHOI, S. Y.; LEE, S. J.; LEE, S.; PARK, K.; KIM, J. S.; OH, S. B. Activation of glia and microglial p38 MAPK in medullary dorsal horn contributes to tactile hypersensitivity following trigeminal sensory nerve injury. **Pain.** v. 121, p. 219-231, 2006.

POLYDEFKIS, M.; HAUER, P.; SHETH, S.; SIRDOFSKY, M.; GRIFFIN, J. W.; MCARTHUR, J. C. The time course of epidermal nerve fibre regeneration: studies in normal controls and in people with diabetes, with and without neuropathy. **Brain**. v. 127, p. 1606-1615, 2004.

POP-BUSUI, R.; BOULTON, A. J.; FELDMAN, E. L.; BRIL, V.; FREEMAN, R.; MALIK, R. A.; SOSENKO, J. M.; ZIEGLER, D. Diabetic neuropathy: a position statement by the american diabetes association. **Diabetes Care**. v. 40, p. 136-154, 2014.

POP-BUSUI, R.; SIMA, A.; STEVENS, M. Diabetic neuropathy and oxidative stress. **Diabetes Metab Res Rev**. v. 22, n. 4, p. 257-273, 2006.

POSTEN, W.; WRONE, D. A.; DOVER, J. S.; ARNDT, K. A.; SILAPUNT, S.; ALAM, M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficiency. **Dermatol Surg**. v. 31, p. 334-340, 2005.

PRICE, S. A.; AGTHONG, S.; MIDDLEMAS, A. B.; TOMLINSON, D. R. Mitogen-activated protein kinase p38 mediates reduced nerve conduction velocity in experimental diabetic neuropathy: interactions with aldose reductase. **Diabetes**. v. 53, p. 1851-1856, 2004.

PULLY, V. V.; LENFERINK, A. T. M.; OTTO, C. Time-lapse Raman imaging of single live lymphocytes. **J Raman Spectrosc**. v. 42, p. 167-173, 2011.

PURVES, T. D.; MIDDLEMAS, A.; AGTHONG, S.; JUDE, E. B.; BOULTON, A. J.; FERNYHOUGH, P.; TOMLINSON, D. R. A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy. **FASEB J**. v. 15, n. 13, p. 2508-2514, 2001.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Arch Int Pharmacodyn Ther**. v. 111, n. 4, p. 409-419, 1957.

ROBERT, A. A.; AL-DAWISH, A.; MUJAMMAMI, M.; AL DAWISH, M. A. Type 1 diabetes mellitus in Saudi Arabia: a soaring epidemic. **Int J of Pediatrics**. v. 2018, p. 1-9, 2018.

RYU, J. J.; YOO, S.; KIM, K. Y.; PARK, J. S.; BANG, S.; LEE, S. H.; YANG, T. J.; CHO, H.; HWANG, S. W. Laser modulation of heat and capsaicin receptor TRPV1 leads to thermal antinociception. **J Dent Res.** v. 89, n. 12, p. 1455-1460, 2010.

SANTANA-BLANK, L. A.; RODRÍGUEZ-SANTANA, E.; SANTANA-RODRÍGUEZ, K. E. Photo-infrared pulsed bio-modulation (PIPBm): a novel mechanism for the enhancement of physiologically reparative responses. **Photomed Laser Ther.** v. 23, n. 4, p. 416-424, 2005.

SARTI, P.; FORTE, E.; MASTRONICOLA, D.; GIUFFRÉ, A.; ARESE, M. Cytochrome c oxidase and nitric oxide in action: molecular mechanisms and pathophysiological implications. **Biochim Biophys Acta.** v. 1817, p. 610–619, 2012.

SATOH, J.; YAGIHASHI, S.; TOYOTA, T. The possible role of tumor necrosis factor- α in diabetic polyneuropathy. **Exp Diabetes Res.** v. 4, n. 2, p. 65-71, 2003.

SCHAFERS, M.; SVENSSON, C. I.; SOMMER, C.; SORKIN, L. S. Tumor necrosis factor- α induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. **J Neurosci.** v. 23, p. 2517-2521, 2003.

SCHREIBER, A. K.; NONES, C. F.; REIS, R. C.; CHICHORRO, J. G.; CUNHA, J. M. Diabetic neuropathic pain: physiopathology and treatment. **World J Diabetes.** v. 6, n. 3, p. 432-444, 2015.

SCHWARTZ, A. V.; VITTINGHOFF, E.; SELLMAYER, D. E.; FEINGOLD, K. R.; DE REKENEIRE, N.; STROTMAYER, E. S.; SHORR, R. I.; VINIK, A. I.; ODDEN, M. C.; PARK, S. W.; FAULKNER, K. A.; HARRIS, T. B.; HEALTH, AGING, AND BODY COMPOSITION STUDY. Diabetes-related complications, glycemic control, and falls in older adults. **Diabetes Care.** v. 31, p. 391-396, 2008.

SHEFER, G.; ORON, U.; IRINTCHEV, A.; WERNING, A.; HALEVY, O. Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway. **J Cell Physiol.** v. 187, p. 73-80, 2001.

SIMA, A. A. New insights into the metabolic and molecular basis for diabetic neuropathy. **Cell Mol Life Sci.** v. 60, n. 11, p. 2445-2464, 2003.

SNYDER-MACKLER, L.; BORK, C. E. Effect of helium-neon laser irradiation on peripheral sensory nerve latency. **Phys Ther.** v. 68, p. 223-225, 1988.

SOMMER, A. P.; PINHEIRO, A. L.; MESTER, A. R.; FRANKE, R. P.; WHELAN, H. T. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. **J Clin Laser Med Surg.** v. 19; p. 29-33, 2001.

STUART, B. H. (2004) Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. Wiley, Chichester.

TANBOGA, I.; EREN, F.; ALTINOK, B.; PEKER, S.; ERTUGRAL, F. The effect of low level laser therapy on pain during dental tooth-cavity preparation in children. **Eur Arch Paediatr Dent.** v. 12, n. 2, p. 93-95, 2011.

TEIXEIRA, J. M.; DOS SANTOS, G. G.; NEVES, A. F.; ATHIE, M. C. P.; BONET, I. J. M.; NISHIJIMA, C. M.; FARIAS, F. H.; FIGUEIREDO, J. G.; HERNANDEZ-OLMOS, V.; ALSHAIBANI, S.; TAMBELI, C. H.; MÜLLER, C. E.; PARADA, C. A. Diabetes-induced neuropathic mechanical hyperalgesia- depends on P2X4 receptor activation in dorsal root ganglia. **Neuroscience.** v. 398, p. 158-170, 2019.

THORNALLEY, P. J. Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. **Int Rev Neurobiol.** v. 50, p. 37-57, 2002.

TOMLINSON, D. R. Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complications. **Diabetologia.** v. 42, p. 1271-1281, 1999.

TOMLINSON, D. R.; GARDINER, N. J. Glucose neurotoxicity. **Nat Rev Neurosci.** v. 9, n. 1, p. 36-45, 2008.

TRUINI, A.; BIASIOTTA, A.; DI STEFANO, G.; LA CESA, S.; LEONE, C.; CARTONI, C.; LEONETTI, F.; CASATO, M.; PERGOLINI, M.; PETRUCCI, M. T.; CRUCCU, G. Peripheral nociceptor sensitization mediates allodynia in patients with distal symmetric polyneuropathy. **J Neurol.** v. 260, p. 761-766, 2012.

TSAI, S. R.; HAMBLIN, M. R. Biological effects and medical applications of infrared radiation. **Photochem Photobiol.** v. 170, p. 197-207, 2017.

TSUCHIYA, D.; KAWATANI, M.; TAKESHIGE, C. Laser irradiation abates neuronal responses to nociceptive stimulation of rat paw skin. **Brain Res Bull.** v. 43, p. 369-374, 1994.

TSUCHIYA, D.; KAWATANI, M.; TAKESHIGE, C.; SATO, T.; MATSUMOTO, I. Diode laser irradiation selectively diminishes slow component of axonal volleys to dorsal roots from the saphenous nerve in the rat. **Neurosci Lett.** v. 161, p. 65-68, 1993.

TSUDA, M.; MIZOKOSHI, A.; SHIGEMOTO-MOGAMI, Y.; KOIZUMI, S.; INOUE, K. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. **Glia.** v. 45, p. 89-95, 2004.

TSUDA, M.; UENO, H.; KATAOKA, A.; TOZAKI-SAITOH, H.; INOUE, K. Activation of dorsal horn microglia contributes to diabetes-induced tactile allodynia via extracellular signal-regulated protein kinase signaling. **Glia.** v. 56, n. 4, p. 378-386, 2008.

TUOMILEHTO, J. The emerging global epidemic of type 1 diabetes. **Current Diabetes Reports.** v.13, n. 6, p. 7958804, 2013.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.** v. 3, n. 7, RESEARCH0034, 2002.

VIEIRA, W. F.; KENZO-KAGAWA, B.; COGO, J. C.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Low-level laser therapy (904 nm) counteracts motor deficit of mice hind

limb following skeletal muscle injury caused by snakebite-mimicking intramuscular venom injection. **PLoS One**. v. 11, n. 7, p. e0158980, 2016.

VIEIRA, W. F.; KENZO-KAGAWA, B.; BRITTO, M. H.; CERAGIOLI, H. J.; SAKANE, K. K.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Vibrational spectroscopy of muscular tissue intoxicated by snake venom and exposed to photobiomodulation therapy. **Lasers Med Sci**. v. 33, n. 3, p. 503-512, 2018.

VINCENT, A. M.; CALLAGHAN, B. C.; SMITH, A. L.; FELDMAN, E. L. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutics targets. **Nat Rev Neurol**. v. 7, p. 573-583, 2011.

VINCENT, A. M.; KATO, K.; MCLEAN, L. L.; SOULES, M. E.; FELDMAN, E. L. Sensory neurons and Schwann cells respond to oxidative stress by increasing antioxidant defense mechanisms. **Antioxid Redox Signal**. v. 11, n. 3, p. 425-438, 2009.

VINCENT, A. M.; MCLEAN, L. L.; BACKUS, C.; FELDMAN, E. L. Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons. **FASEB J**. v. 19, p. 638-640, 2005.

VLADIMIROV, Y. A.; OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry**. v. 69, n. 1, p. 103-113, 2004.

VON LEDEN, R. E.; COONEY, S. J.; FERRARA, T. M.; ZHAO, Y.; DALGARD, C. L.; ANDERS, J. J.; BYRNES, K. R. 808nm wavelength light induces a dose-dependent alteration in microglial polarization and resultant microglial induced neurite growth. **Lasers Surg Med**. v. 45, n. 4, p. 253-263, 2013.

VRINTEN, D. H.; HAMERS, F. F. T. 'CatWalk' automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. **Pain**. v. 102, p. 203-209, 2003.

WALT. World Association for Laser Therapy, Dosage recommendation: 1994 [Revised April 2010]; Disponível em: <http://waltza.co.za/documentation-links/recommendations/>.

WANG, H.; SPINNER, R. J.; SORENSON, E. J.; WINDEBANK, A. J. Measurement of forelimb function by digital video motion analysis in rat nerve transaction models. **J Peripher Nerv Syst.** v. 13, p. 92-102, 2008.

WANG, Y.; SCHMEICHEL, A. M.; IIDA, H.; SCHMELZER, J. D.; LOW, P. A. Enhanced inflammatory response via activation of NF-kappaB in acute experimental diabetic neuropathy subjected to ischemia-reperfusion injury. **J Neurol Sci.** v. 247, p. 47-52, 2006.

WATSON, F. L.; HEERSEN, H. M.; BHATTACHARYYA, A.; KLESSE, L.; LIN, M. Z.; SEGAL, R. A. Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. **Nat Neurosci.** v. 4, p. 981-988, 2001.

WEIDE, L. G.; LACY, P. E. Low-dose streptozocin-induced autoimmune diabetes in islet transplantation model. **Diabetes.** v. 40, p. 1157-1162, 1991.

WESSELMANN, U.; LIN, S. F.; RYMER, W. Z. Effects of Q-switched Nd: YAG laser irradiation on neural impulse propagation: II. Dorsal roots and peripheral nerves. **Physiol Chem Phys Med NMR.** v. 23, n. 2, p. 81-100, 1991.

WITTMACK, E. K.; RUSH, A. M.; HUDMON, A.; WAXMAN, S. G.; DIB-HAJJ, S. D. Voltage-gated sodium channel Nav1.6 is modulated by p38 mitogen-activated protein kinase. **J Neuroscience.** v. 25, p. 6621-6630, 2005.

WODARSKI, R.; CLARK, A. K.; GRIST, J.; MARCHAND, F.; MALCANGIO, M. Gabapentin reverses microglial activation in the spinal cord of streptozotocin induced diabetic rats. **Eur J Pain.** v. 13, n. 8, p. 807-811, 2009.

WONG-RILEY, M. T.; LIANG, H. L.; EELLS, J. T.; CHANCE, B.; HENRY, M. M.; BUCHMANN, E.; KANE, M.; WHELAN, H. T. Photobiomodulation directly benefits

primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. **J Biol Chem.** v. 280, p. 4761-4771, 2005.

WRIGHT, D. E.; RYALS, J. M.; MCCARSON, K. E.; CHRISTIANSON, J. A. Diabetes-induced expression of activating transcription factor 3 in mouse primary sensory neurons. **J Peripher Nerv Syst.** v. 9, p. 242-254, 2004.

WU, K. K.; HUAN, Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. **Curr Protoc Pharmacol.** capítulo 5, unidade 5.47, 2008.

WUARIN-BIERMAN, L.; ZAHND, G. R.; KAUFMANN, F.; BURCKLEN, L.; ADLER, J. Hyperalgesia in spontaneous and experimental animal models of diabetic neuropathy. **Diabetologia.** v. 30, n. 8, p. 653-658, 1987.

XU, J. T.; XIN, W. J.; WEI, X. H.; WU, C. Y.; GE, Y. X.; LIU, Y. L.; ZANG, Y.; ZHANG, T.; LI, Y. Y.; LIU, X. G. p38 activation in uninjured primary afferent neurons and in spinal microglia contributes to the development of neuropathic pain induced by selective motor fiber injury. **Exp Neurol.** v. 204, p. 355-365, 2007.

YAGIHASHI, S.; MIZUKAMI, H.; SUGIMOTO, K. Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go? **J Diabetes Invest.** v. 2, p. 18-32, 2010.

YAGIHASHI, S.; YAMAGISHI, S.; WADA, R. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: correlation with clinical signs and symptoms. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 77, n. 1, p. 184-189, 2007.

YAMAGISHI, S.; OGASAWARA, S.; MIZUKAMI, H.; YAJIMA, N.; WADA, R.; SUGAWARA, A.; YAGIHASHI, S. Correction of protein kinase C activity and macrophage migration in peripheral nerve by pioglitazone, peroxisome proliferator activated-gamma-ligand, in insulin-deficient diabetic rats. **J Neurochem.** v. 104, p. 491-499, 2008.

YAN, L-J. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. **J Diabetes Res.** v. 2014, p. 137919, 2014.

YANG, S. H.; SHARROCKS, A. D.; WHITMARSH, A. J. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. **Gene.** v. 320, p. 3-21, 2003.

YANG, W. Z.; CHEN, J. Y.; YU, J. T.; ZHOU, L. W. Effects of low power laser irradiation on intracellular calcium and histamine release in RBL-2H3 mast cells. **Photochem Photobiol.** v. 83, n. 4, p. 979-984, 2007.

YOUNGER, D. S.; ROSOKLIJA, G.; HAYS, A. P.; TROJABORG, W.; LATOV, N. Diabetic peripheral neuropathy: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of sural nerve biopsies. **Muscle Nerve.** v. 19, p. 722-727, 1996.

ZHANG, H.; MEI, X.; ZHANG, P.; MA, C.; WHITE, F. A.; DONNELLY, D. F.; La MOTTE, R. H. Altered functional properties of satellite glial cells in compressed spinal ganglia. **Glia.** v. 57, n. 15, p. 1588-1599, 2009.

ZHANG, J. M.; SONG, X. J.; LaMOTTE, R. H. Enhanced excitability of sensory neurons in rats with cutaneous hyperalgesia produced by chronic compression of the dorsal root ganglion. **J Neurophysiol.** v. 82, p. 3359-3366, 1999.

ZOCHODNE, D. W. Neurotrophins and other growth factors in diabetic neuropathy. **Semin Neurol.** v. 16, n. 2, p. 153-161, 1996.

ZOCHODNE, D. W.; RAMJI, N.; TOTH, C. Neuronal targeting in diabetes mellitus: a story of sensory neurons and motor neurons. **Neuroscientist.** v. 14, p. 311-313, 2008.

APÊNDICES

Apêndice 1

Apresentação de pôster no 6th International Congress on Neuropathic Pain (NeuPSIG/IASP), 15-18 de Junho de 2017, Gotemburgo – Suécia.



Gait analysis as a correlate of hyperalgesia in a model of streptozotocin (STZ)-induced diabetic neuropathy: a CatWalk dynamic motor function study

W. F. Vieira¹; G. G. Santos¹; K. F. Malange^{1,2}; J. G. Schiavuzzo¹; C. A. Parada¹

¹Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas – Sao Paulo, Brazil.

²Center of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande – Mato Grosso do Sul, Brazil.

Background and aims: Peripheral neuropathy is a complication of diabetes, involving sensorial and motor nerves. Besides pain, this condition could be associated with a decline in motor compound action potential with alterations in plantar pressure during gait. The aim of this study was identify motor alterations in Streptozotocin (STZ)-induced diabetic neuropathic rats and correlate it with mechanical withdrawal thresholds. **Methods:** All experiments were approved by UNICAMP Ethic's Committee (CEUA 3902-1). Male Lewis rats (200-250 g) received a STZ-low dose (25 mg/kg) or 0.1 M sodium citrate buffer (SCB, control group) once a day during five days. Diabetic animals (250 mg/dL blood glucose) were submitted to electronic von Frey and CatWalk tests (Noldus Inc., the Netherlands) at 0, 7, 14, 21 and 28 days after STZ injections. **Results:** STZ (25 mg/kg) but not SCB induced diabetes. After the 14th day (STZ)-induced diabetic rats showed a mechanical hyperalgesia and a reduction in the hindlimbs Footprint Intensities, respectively analyzed by electronic von Frey and CatWalk test ($p < 0.05$; Two-Way ANOVA, Bonferroni posttest). At 28th day the animals showed alterations in Spatial parameters (Max. Contact Area; Stride Length; Print Area). These parameters were strongly correlated with mechanical withdrawal thresholds, according to Pearson's Correlation Coefficients. **Conclusions:** The CatWalk gait parameters can be used as a coadjuvant tool to investigate the development of hyperalgesia in STZ-induced diabetic rats.

Apêndice 2

Apresentação de pôster no 6th International Congress on Neuropathic Pain (NeuPSIG/IASP), 15-18 de Junho de 2017, Gotemburgo – Suécia.



Low-level laser therapy (904 nm) reduces hyperalgesia through daily irradiation at dorsal root ganglia in streptozotocin (STZ)-induced diabetic neuropathic rats

W. F. Vieira¹; S. F. Magalhães¹; J. G. Schiavuzzo¹; C. A. Parada¹

¹Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas – Sao Paulo, Brazil.

Background and aims: Diabetic neuropathy develops as a complication of diabetes and few of the used therapies have been successful. Efficacy of low-level laser therapy (LLLT) in painful clinical conditions has been established by several recent studies. The aim of this study was verify the pain relief potential of LLLT in Streptozotocin (STZ)-induced diabetic neuropathic rats. **Methods:** All experiments were approved by the UNICAMP Ethic's Committee (CEUA #3902-1). Male Lewis rats (LEW/HsdUnib) (200-250 g; 6-8-weeks-old) received a STZ-low dose (25 mg/kg) once a day during five consecutive days. Animals were considered diabetic when reach a 250 mg/dL blood glucose level and were submitted to electronic von Frey test at 0, 7, 14, 21, 24 and 28 days after STZ injections. 0.1 M sodium citrate buffer was used as control. After being considered neuropathic, rats were submitted to daily LLLT (after the 21st day) (GaAs 904 nm; 2.03 Joules; 70 mW; 29 seconds). LLLT was performed transcutaneously at the dorsal region between L4/L5 DRG (right and left) while the animals were kept under anesthesia (2% isoflurane). **Results:** LLLT was able to reduce the intensity of hyperalgesia (Δ withdrawal threshold, g) on the 24th and 28th days after STZ injections when compared to diabetic neuropathic non-irradiated rats ($p < 0.001$; Two-Way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test). **Conclusions:** The data of this study, although preliminary, suggest that LLLT could be a promising treatment to alleviate pain during diabetic neuropathy. The probable action mechanism of this therapy is under investigation in our laboratory.

Apêndice 3

Apresentação de pôster no **9th World Congress of the World Institute of Pain (WIP2018)**, 09-12 de Maio de 2018, Dublin – Irlanda.



Anti-hyperalgesic effects of low-level laser therapy (904 nm) in streptozotocin (STZ)-induced diabetic neuropathic rats: possible involvement of MAPK pathway

W. F. Vieira¹; S. F. Magalhães¹; K. F. Malange¹; C. A. Parada¹.

¹Laboratory for Pain Studies; Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas – Sao Paulo, Brazil.

Objectives: Due the pro-inflammatory condition, diabetic neuropathy (DN) can be related to the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) like p38. MAPK pathway is activated in response to extracellular stimulus, including interleukins, e.g. TNF- α and IL-1 β . Efficacy of low-level laser therapy (LLLT) in painful clinical conditions has been established by several recent studies. The aim of this study was verify the pain relief potential of LLLT in streptozotocin (STZ)-induced diabetic neuropathic rats and its influence on the MAPK pathway regulation. **Methods:** Experiments were approved by the UNICAMP Ethic's Committee (CEUA #3902-1). Male Lewis rats (200-250 g; 6-8-weeks-old) received 5x STZ-low doses (25 mg/kg). Diabetic animals (≥ 250 mg/dL blood glucose) were submitted to electronic von Frey test at 0, 7, 14, 21, 24 and 28 days after STZ injections. After being considered neuropathic, rats were submitted to daily LLLT (between the 21st and 28th days) (GaAs 904 nm; 2.03 Joule; 70 mW; 29 seconds), transcutaneously, at the dorsal region between L4/L5 DRG (right and left). At 28th day DRG were collected and used to ELISA, real-time RT-qPCR, and immunofluorescence assays. **Results:** LLLT was able to reduce the intensity of hyperalgesia at the 24th and 28th days, decreased TNF- α and IL-1 β levels, and p38-MAPK mRNA expression when comparing to non-treated animals. DN induced the activation of phosphorylated p38 (p-38) MAPK and this activation was partially prevented by LLLT. **Conclusions:** DN promoted an increase of p38-MAPK expression related to the presence of pro-inflammatory interleukins and the LLLT (904 nm) treatment counteracted this condition.

Apêndice 4

Apresentação de pôster no **9th World Congress of the World Institute of Pain (WIP2018)**, 09-12 de Maio de 2018, Dublin – Irlanda.



Characterization of dorsal root ganglia of streptozotocin (STZ)-induced diabetic neuropathic rats submitted to photobiomodulation therapy by Raman spectroscopy.

W. F. Vieira¹; S. F. Magalhães¹; F. H. Farias¹; A. A. de Thomaz²; C. A. Parada¹.

¹Laboratory for Pain Studies; Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas – Sao Paulo, Brazil;

²Department of Quantum Electronics, Institute of Physics Gleb Wataghin, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas – Sao Paulo, Brazil;

Objectives: Raman spectroscopy has been used as a new tool to investigate pathological conditions through chemical bonds alterations in biological tissues. Photobiomodulation therapy (PBMT) has beneficial effects on the treatment of neuropathic pain. Therefore, the objective of this study was to use Raman spectroscopy to characterize possible spectral alterations in dorsal root ganglia (DRG) of streptozotocin (STZ)-induced diabetic neuropathic (DN) rats and the influence of PBMT over such spectra. **Methods:** Experiments were approved by the UNICAMP Ethic's Committee (#3902-1). Male Lewis rats (200-250 g; 6-8-weeks-old) received 5x STZ-low doses (25 mg/kg). After 21 days, diabetic neuropathic animals were submitted to daily PBMT (between 21st and 28th days) (GaAs 904 nm; 2.03 J; 70 mW; 29 s) at the dorsal region between L4/L5, bilaterally. At 28th day DRG were collected, frozen in liquid nitrogen (-196° C) and used to acquire Raman spectrum in a Lab Aramis Instrument (Horiba®). **Results:** We identified three characteristic peaks of DRG tissue: 2850 cm⁻¹, 2885 cm⁻¹, and 2940 cm⁻¹, whose assignments are CH₂/CH₃ symmetric stretch of lipids, CH₂/CH₃ asymmetric stretch of lipids and proteins, and C-H vibrations in lipids and proteins, respectively. DRG from DN rats showed an increase in the normalized intensity of the 2850 cm⁻¹ and 2885 cm⁻¹ peaks. These same peaks had their normalized intensity reduced after PBMT. **Conclusions:** Raman spectroscopy was able to diagnose spectral alterations in DRG of STZ-induced diabetic neuropathic animals and the influence of PBMT over such alterations. We are still investigating the molecular relation between CH₂/CH₃ stretching in DRG and neuropathic pain.

Apêndice 5

Apresentação Oral no 9th World Congress of the World Institute of Pain (WIP2018), 09-12 de Maio de 2018, Dublin – Irlanda.



Photobiomodulation therapy through low-level laser irradiation (904 nm) counteracts gait alterations caused by diabetic neuropathy: a CatWalk dynamic motor function study.

W. F. Vieira¹; S. F. Magalhães¹; G. G. dos Santos¹; K. F. Malange¹; J. G. Schiavuzzo¹; C. A. Parada¹.

Laboratory for Pain Studies; Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas – Sao Paulo, Brazil.

Objectives: Diabetic neuropathy (DN) could be associated with declines in motor compound action potential and abnormalities in plantar pressure during gait. Photobiomodulation therapy (PBMT) has evident effects on the treatment of pain and restitution of motor alterations in various types of disease. The aim of this study was verify the influence of PBMT over hyperalgesia and gait altered parameters related to DN. **Methods:** Experiments were approved by the UNICAMP Ethic's Committee (#3902-1). Male Lewis rats (200-250 g; 6-8-weeks-old) received 5x Streptozotocin (STZ)-low doses (25 mg/kg). Sodium citrate buffer (0.1 M) was used as control. Diabetic animals (≥ 250 mg/dL blood glucose) were submitted to electronic von Frey and CatWalk (Noldus Inc., the Netherlands) tests at 0, 7, 14, 21 and 28 days after STZ injections. DN rats were submitted to daily PBMT through low-level laser irradiation, between the 21st and 28th days (GaAs 904 nm; 2.03 Joules; 70 mW; 29 seconds), transcutaneously, at the dorsal region between L4/L5 DRG (right and left). **Results:** PBMT was able to reduce the intensity of hyperalgesia (Δ withdrawal threshold, g) when compared to DN non-irradiated rats. We detected alterations in CatWalk spatial gait parameters of DN animals [Max. Contact Area (cm²); Print Area (cm²); Stride length (cm)] that were strongly correlated with withdrawal thresholds, assessed by electronic von Frey test. Such spatial parameters were counteracted by PBMT at 28 days after STZ injections. **Conclusions:** PBMT was able to reduce hyperalgesia in STZ-induced diabetic neuropathic rats and ameliorate spatial gait parameters analyzed by the CatWalk system.

Apêndice 6

FAPESP International Internship Fellowship Final Report (BEPE/FAPESP)

STATE UNIVERSITY OF CAMPINAS (UNICAMP)
INSTITUTE OF BIOLOGY
DEPARTMENT OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL BIOLOGY
Brazil

MINES SAINT-ÉTIENNE (EMSE)
CENTRE MICROÉLECTRONIQUE DE PROVENCE
DEPARTMENT OF BIOELECTRONICS (BEL)
France

**Direct influence of low-level laser irradiation on neurons: an electrophysiological study
to helping comprise analgesic effects of infrared light in diabetic neuropathy**

FAPESP International Research Internship
Fellowship (BEPE) final report
October 1st 2018 – September 30th 2019
Process: 2018/05108-8

PhD student:

Willians Fernando Vieira, MSc

Supervisor:

Professor Carlos Amilcar Parada, PhD

**Host Supervisor at École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne (EMSE) -
Department of Bioelectronics, Centre Microélectronique de Provence – Georges
Charpak Campus, Gardanne - France:**
Professor Rodney P. O'Connor, PhD

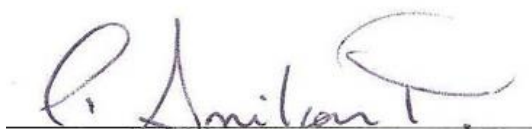
**Campinas, 2019
Brazil**

**Direct influence of low-level laser irradiation on neurons: an electrophysiological study
to helping comprise analgesic effects of infrared light in diabetic neuropathy**

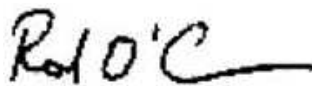
FAPESP International Research Internship
Fellowship (BEPE) final report
October 1st 2018 – September 30th 2019
Process: 2018/05108-8



PhD student: Willians Fernando Vieira, MSc.



Supervisor: Carlos Amilcar Parada, PhD



Host Supervisor: Rodney Phillip O'Connor, PhD

Campinas, 2019

Brazil

SUMMARY

Approximately 60 % of the diabetic patients develop peripheral neuropathy with irreversible complications to the peripheral nervous system. Hyperglycemia is the majoritarian cause of oxidative stress and promotes a suitable environment to damage peripheral nerves and neurotransmitter pathways. Nociceptors could be selectively modulated by photobiomodulation therapy (PBMT), and it has been proposed that this effect underpins the pain-relieving effects of PBMT in the treatment of acute and chronic pain. In cell culture studies using rat dorsal root ganglia (DRG) neurons, infrared light at 830 and 808 nm PBMT have promoted reversible neurophysiological changes in the mitochondrial membrane potential (MMP). However, no study showed the direct effect of the infrared laser irradiation on the membrane potentials of sensitized neurons in a condition of hyperglycemic oxidative-stress-environment, mimicking a diabetic neuropathy situation. Thus, the general goal of this study was to comprise the direct influence of PBMT in the mitochondrial and neuronal membrane potentials of rat DRG afferent neurons. Firstly, we used immortalized cell cultures of U87 (human primary glioblastoma cell), NG108-15 (mouse neuroblastoma x rat glioma hybrid), and HT22 (mouse hippocampal) neurons and, after a pilot study, DRG neurons were collected from male LEW/HsdUnib (Lewis) isogenic rats (4-weeks-old) and incubated under low- (5.5 mM) or high-glucose (55 mM). After 24 hours, DRG neurons were exposed to GaAs (904 nm) infrared laser irradiation, using an Endophoton LLT-1307 laser device (KLD Biosystems® - Brazil, class IIIB; continuous wave; energy 70 mJ or 2.03 Joule; 1 or 29 seconds; 5 or 20 mW power; 0.001 cm² output beam; 7,000 mW/cm² irradiance) coupled to an optical-fiber customized system. During laser irradiation, we monitored the MMP through tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRE), and the neuronal membrane potential through FluoVoltTM fluorescence. DRG neurons were also submitted to electrophysiological recordings by patch clamp whole-cell. These experiments were selected in an attempt to help us to comprise the possible effects of PBMT in the mitochondrial and electrical activity of neurons, as important mechanisms for the pain relief that we have observed *in vivo*.

Keywords: diabetic neuropathy; photobiomodulation; mitochondria membrane potential; patch-clamp; dorsal root ganglia.

RÉSUMÉ

Environ 60% des patients diabétiques développent une neuropathie périphérique avec des complications irréversibles au système nerveux périphérique. L'hyperglycémie est la cause majoritaire du stress oxydatif et favorise un environnement approprié pour endommager les nerfs périphériques et les voies des neurotransmetteurs. Les nocicepteurs pourraient être modulés de manière sélective par la thérapie par photobiomodulation (PBMT), et il a été proposé que cet effet sous-tend les effets analgésiques du PBMT dans le traitement de la douleur aiguë et chronique. Dans les études de culture cellulaire utilisant des neurones de ganglions de la racine dorsale de rat (DRG), la lumière infrarouge à 830 et 808 nm PBMT a favorisé des changements neurophysiologiques réversibles dans le potentiel de la membrane mitochondriale (MMP). Cependant, aucune étude n'a montré l'effet direct de l'irradiation laser infrarouge sur les potentiels membranaires des neurones sensibilisés dans un état de stress oxydatif hyperglycémique, imitant une situation de neuropathie diabétique. Ainsi, l'objectif général de cette étude était de comprendre l'influence directe du PBMT dans les potentiels membranaires mitochondriaux et neuronaux des neurones afférents DRG de rat. Premièrement, nous avons utilisé des cultures de cellules immortalisées de neurones U87 (cellules de glioblastome primaire humain), NG108-15 (neuroblastome de souris x gliome de rat) et HT22 (hippocampe de souris) et, après une étude pilote, des neurones DRG ont été collectés à partir de LEW mâles / HsdUnib (Lewis) rats isogéniques (âgés de 4 semaines) et incubés sous faible (5,5 mM) ou riche en glucose (55 mM). Après 24 heures, les neurones DRG ont été exposés à une irradiation laser infrarouge AsGa (904 nm), à l'aide d'un appareil laser Endophoton LLT-1307 (KLD Biosystems® - Brésil, classe IIIB; onde continue; énergie 70 mJ ou 2,03 Joule; 1 ou 29 secondes ; puissance de 5 ou 20 mW; faisceau de sortie de 0,001 cm²; irradiance de 7 000 mW / cm²) couplé à un système personnalisé à fibre optique. Pendant l'irradiation au laser, nous avons surveillé le MMP par l'ester méthylique de tétraméthyl rhodamine (TMRE), et le potentiel de la membrane neuronale par fluorescence FluoVoltTM. Les neurones DRG ont également été soumis à des enregistrements électrophysiologiques par patch clamp cellule entière. Ces expériences ont été sélectionnées dans le but de nous aider à comprendre les effets possibles du PBMT dans l'activité mitochondriale et électrique des neurones, en tant que mécanismes importants pour le soulagement de la douleur que nous avons observés *in vivo*.

Mots-clés: neuropathie diabétique; photobiomodulation; potentiel de membrane des mitochondries; patch-clamp; ganglions de la racine dorsale.

1 INTRODUCTION

1.1 Brief review of the literature

Approximately 50% of the diabetic patients develop peripheral neuropathy with irreversible complications to the peripheral nervous system (Feldman *et al.*, 2002; Wright *et al.*, 2004; Zochodne *et al.*, 2008). Diabetes can damage the peripheral nervous system (PNS) in a variety of ways, and the diabetic neuropathy (DN) is one of the most common complication of untreated diabetes (Feldman *et al.*, 2017). DN is characterized as a chronic complex disorder, which affects the peripheral nerves, causing a painful condition on superior and inferior limbs (Truini *et al.*, 2013; Callaghan *et al.*, 2014; Jensen and Finnerup, 2014; Feldman *et al.*, 2017) in about 70 % of diabetic patients (Gandhi and Selvarajah, 2015; Harris *et al.*, 2018). Due to the multiplex character of the peripheral diabetic neuropathy (PDN), there is a poorly response to the administration of analgesic and opiate drugs (Edwards *et al.*, 2008; Callaghan *et al.*, 2012; Chiang *et al.*, 2014; Gandhi and Selvarajah, 2015).

The exactly mechanisms by which hyperglycemia leads to peripheral nerve injury are not very clear (Yagihashi *et al.*, 2011), but is already known that the main events involve the polyol pathway, through the aldose reductase (AR) activation (Brownlee, 2001; Yan, 2014; Schreiber *et al.*, 2015; Lee and Chung, 2018), the protein glycosylation, and the advanced glycation end-products (AGEs) production (Thornalley, 2002; Yan, 2014; Juranek *et al.*, 2015). In addition, the free radicals formation linked to oxidative stress (Greene *et al.*, 1999; Pop-Busui *et al.*, 2006), the reduced neurotrophic support (Ishii and Lupien, 1994; Fernyhough and Calcutt, 2010), and the increased protein kinase C activation (PKC) (Koya *et al.*, 1997; Brownlee, 2001) contribute to the peripheral damage. As a result of the metabolic imbalance, it culminates in mitochondrial failure (Chowdhury *et al.*, 2010; Akude *et al.*, 2011; Yan, 2014) and inflammatory processes, related to phosphorylation of mitogen activated protein kinases (MAPKs) (Younger *et al.*, 1996; Satoh *et al.*, 2003; Tomlinson and Gardiner, 2008; Yamagishi *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2010).

Sensation is essential to the organism's survival and wellbeing. The transmission of stimuli is dependent on the sensory pathways, from the peripheral endings of axons to the primary sensory neurons located in the dorsal root ganglia (DRG). These sensory neurons are considered gatekeepers of the sensory information (Basbaum *et al.*, 2009; Gong *et al.*, 2016). When exposed to high concentrations of glucose, as in a diabetic condition, the afferent neurons can have it function disturbed, which causes impairments on cell metabolism and

survival. In this sense, intact DRG provide a close *in vivo* condition, and have been used to investigate changes of primary sensory neurons in different conditions associated with chronic pain (Zhang *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2011a; 2011b).

Recent studies have shown that photobiomodulation (PBMT) through low-level laser irradiation, can promote beneficial effects in tissue regeneration and functional recovering, not related to thermal effects (Mochizuki-Oda *et al.*, 2002; Byrnes *et al.*, 2005; Rochkind *et al.*, 2009; Gigo-Benato *et al.*, 2010; Peplow *et al.*, 2011; von Leden *et al.*, 2013; Takhtfooladi *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2016; Vieira *et al.*, 2017). PBMT has also been successfully used in the treatment of both acute and chronic pain in the peripheral nervous system (Bjordal *et al.*, 2007; Chow *et al.*, 2011; Holanda *et al.*, 2017; Vieira *et al.*, 2019).

The ability of the photons introduced as PBMT to modify bioelectrical signaling in peripheral nerves has been unequivocally demonstrated in animal and human models (Chow *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2011). The suppression of action potentials in nociceptors is one of the possible mechanisms for the direct analgesic effects of PBMT (Chow *et al.*, 2011). Nociceptors could be selectively affected by laser irradiation, and it has been proposed that this effect underpins the pain-relieving effects of PBMT in the treatment of acute and chronic pain (Liebert *et al.*, 2016), such as in PDN. However, the exactly mechanism of PBMT on neuropathic pain is not fully understood (Hsieh *et al.*, 2012; Hsieh *et al.*, 2015; Holanda *et al.*, 2017; Vieira *et al.*, 2019).

One of the earliest electrophysiological studies of light effects on nerves showed that 490 nm irradiation induced neural inhibition in the abdominal ganglion neurons of the marine mollusc *Aplysia Californica* (Arvanitaki and Chalazonitis, 1961). In cell culture studies using rat DRG, 830, 808, and 650 nm PBMT resulted in reversible neurophysiological changes of significantly decreased mitochondrial membrane potential (MMP) (Chow *et al.*, 2007). Ryu and colleagues (2010) attributed nociception prevention to the inhibition of TRPV1 channels, once TRPV1-mediated Ca^{2+} influx was decreased in transfected HeLa cells previously submitted to PBMT. However, no study showed the direct effect of the infrared laser irradiation (904 nm) on sensitized neurons in a condition of hyperglycemic oxidative stress environment that mimics a PDN situation.

1.2 Previous results

We have observed analgesic effects promoted by PBMT (904 nm) applied on dorsal region of L4/L5 lumbar levels in streptozotocin (STZ)-induced diabetic neuropathic rats, 28

days after the beginning of the STZ injections. The characteristic mechanical hyperalgesia observed in rats with PDN was accompanied by impairments on rats' dynamic motor function. However, when we applied the PBMT, it was able to counteract those altered gait parameters (Max. Contact Area (cm²); Print Area (cm²); Stride Length (cm)), which are strongly correlated to mechanical hyperalgesia, according to Pearson's Correlation Coefficient.

Additionally, we used Raman spectroscopy to characterize the spectral DRG identities of STZ-induced diabetic neuropathic (hyperalgesic) rats and to study the influence of PBMT over such spectra. Characteristic DRG peaks were identified at 2704, 2850, 2885, 2940, 3061 and 3160 cm⁻¹, whose assignments are CH₂/CH₃ symmetric/asymmetric stretches, and C-H vibrations of lipids and proteins. DRG from hyperalgesic rats showed an increased normalized intensity of 2704, 2850, 2885 and 3160 cm⁻¹. These same peaks had their normalized intensity reduced after PBMT treatment, accompanied by an anti-hyperalgesic effect. Raman spectroscopy was able to diagnose spectral alterations in DRG of hyperalgesic rats and the PBMT reduced the intensity of hyperalgesia and the altered Raman spectra.

When analyzing the L4/L5 DRG by molecular approaches (ELISA, Western blot, Real-time RT-qPCR), our data showed that PBMT reduced the concentration of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β) when compared to neuropathic rats without treatment. The expression of the encoding genes p38, ERK1/2, JNK, and its respective proteins translation related to MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathways in DRG were also diminished by the PBMT. Also, we have studied the effects of PBMT in the calcium dynamics influx in DRG neurons cultivated in normoglycemic (5.5 mM of glucose) and hyperglycemic medium (55 mM of glucose), and in both cases, calcium influx (through FLUO-4 AM signal) was reduced by the PBMT previous application, characterizing a possible "hyperpolarizing effect" over the neurons, which could explain the *in vivo* analgesic effects promoted by PBMT treatment. However, the theory about the hyperpolarizing effect promoted by PBMT over the neurons must be electrophysiologically studied and proven.

2 GOALS

The general goal of this study is to comprise the direct influence of PBMT in the mitochondrial membrane potential and in the electrical activity of DRG afferent neurons, which are key-cells for nociceptive sensitization. These cells are targets for the treatment of

neuropathic pain, including peripheral diabetic neuropathy. The findings of this study can help us to understand the analgesic effects promoted by PBMT *in vivo*. Specific goals are listed as follows:

2.1 Specific goals

- Verify the influence of PBMT through infrared light (904 nm) over the mitochondrial membrane potential (MMP) of DRG afferent neurons from LEW/HsdUnib (Lewis) isogenic rats by Tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate (TMRE) fluorescence;
- Analyze possible effects of PBMT in the neuronal membrane potential of the DRG afferent neurons, using a voltage sensitive fluorescent probe-based kit (FluoVolt™);
- Perform electrophysiological experiments by Patch Clamp whole-cell with DRG afferent neurons to verify the PBMT influence on the triggering of action potentials;
- Investigate the effects of oxidative stress caused by the hyperglycemic environment (mimicking a diabetic condition) over the mitochondrial and neuronal membrane potentials, and the influence of PBMT over the DRG neurons responsiveness.

3 ACCOMPLISHED ACTIVITIES

During my twelve month-internship, I accomplished activities in laboratory training and research. At the beginning of the project, I joined the **“Biological and Chemical Safety Training”**, and after that I was able to access all the laboratories at Georges Charpak Campus (CMP), EMSE, Gardanne, Provence-Alpes-Côte D’Azur, France. I actively participated in weekly lab meetings, where progress in the lab is presented and critiqued by all lab members. I had also attended departmental and campus-wide seminars presented by Mines Saint-Étienne faculty and visiting scholars from other institutions. I was invited by Professor David Moreau, PhD, to present a seminar about my research project for undergraduate students of the **“Biomedical Devices Program”**. Also, I have participated of the **“Pitches de doctorants : leurs travaux de thèse en 3 mn” (Three Minute Thesis Competition), Journée de la recherche 2019 du CMP**, and it was an excellent opportunity to share my research with colleagues from other departments of EMSE-CMP.

About the developed activities inherent the project, I managed to set up all the microscopy system and to align the customized optical-fiber system allowing the light injection to be delivery to the cells during imaging. I have reproduced the protocol for DRG

collection and culture, and I had the opportunity to learn how to work with immortalized tumorous cell lines, which are not part of our research in Brazil. I got the possibility to deal with very modern and expensive dyes for membrane potentials measurements, which aggregated a lot to my project. All planned experiments on the original project were performed, with very little changes from the original proposal.

During this period in France, I attended two conferences for presenting partial results from my PhD project: **World Confederation for Physical Therapy (WCPT) Congress 2019**, Geneva – Switzerland (10-13 of May 2019) and the **11th Congress of the European Pain Federation (EFIC® 2019)**, Valencia – Spain (4-7 of September 2019). Both conferences gave me the opportunity to share knowledge and experience with delegates from different parts of the world. The presented abstracts and the certificates of attendance are attached in APPENDIX section.

4 MATERIALS AND METHODS

4.1 Ethics statement and animals

All experiments were performed in accordance with the Brazilian and European councils for animal experimentation: Brazilian National Council for Animal Experimentation (CONCEA); Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA); Council Directive 2010/63EU of the European Parliament; Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Experiments were also approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Use (CEUA/UNICAMP, protocol no. 3902-1) and followed the ARRIVE guidelines. Eighteen male Lewis rats (LEW/HsdUnib, Harlan, 1996), 4-week-old, weighing about 150 g, were provided by Charles River Laboratories (Research Models and Services, Germany GmbH) and maintained in plastic cages (three per cage) and received food and water ad libitum, in a temperature- and humidity-controlled room, under 12/12 hours' dark/light cycle, at the Institut de Neurosciences des Systèmes (INS, INSERM UMR_S 1106) at Aix-Marseille Université, Marseille, France.

4.2 Immortalized cell cultures (U87, HT22, and NG108-15)

Firstly, we used immortalized cell cultures of U87 (human glioblastoma), HT22 (mouse hippocampal neurons), and NG108-15 (mouse neuroblastoma x rat glioma hybrid) as controls and for testing the good microscopy parameters and chemicals concentrations. The

thawing and growing protocols followed the datasheet provided by the manufacturer, but in general were done according described below:

- *Liquid nitrogen storage*: complete growth medium supplemented with 5 % (v/v) DMSO in 1 ml aliquots of approximately 5×10^6 cells;

- *Cell growth medium*: DMEM (Gibco/Invitrogen) + 10 % fetal bovine serum (HyClone) + 100 units/ml penicillin + 100 µg/ml streptomycin + 5 % CO₂ at 37 °C;

- *Cell thawing and subculturing*: we quickly thawed out 1 ml aliquot of cells in water bath at 37 °C and transferred the cells to 9 ml warm media in a 15-ml conical tube. After gently mixing, we centrifuged at 1,200 rpm for 5 minutes to pellet the cells. Cell media were discarded and the pellet was resuspended in 10 ml warm DMEM. Cells were divided into two T75 flasks containing 10 ml of warm DMEM and placed in the incubator (5 % CO₂ at 37 °C). After two days, we replaced the medium for a fresh one. When cells were 70-90 % confluent, we split them at 1:4. For that, we removed and discarded the DMEM and briefly rinsed the cell layer with an equal volume PBS pH 7.4 (Gibco/Invitrogen). After discarding the PBS, we added 3 ml of 0.25 % (w/v) trypsin + 0.53 mM EDTA (Gibco/Invitrogen) solution to flask and observed the cells under a microscope until cell layer was dispersed (usually within 5 minutes). We added 7-10 ml of complete DMEM and collected the cells by gently pipetting. Appropriate aliquots of the cell suspension (30-70 µl) were added to 35 mm-petri-dishes.

After 24 h, we replaced the cell media for normoglycemic (5.5 mM of glucose) or hyperglycemic (55 mM of glucose) DMEM and then, after 24 h, we performed experiments to measure the mitochondrial membrane potential (MMP) for standardization of the technique and the microscope setup.

4.3 Dorsal root ganglia (DRG) primary cell culture

After cervical dislocation euthanasia performed by a trained technician, DRG were collected from healthy male LEW/HsdUnib (Lewis) isogenic rats (4-weeks-old; 150 mg) (about 16 DRG per rat) and placed in sterile petri dishes containing cold HBSS (without calcium and magnesium) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). HBSS was removed and replaced by 5 mg/ml collagenase (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) for 60 min at 37 °C. Then, isolated DRG were resuspended in 1 ml of 0.12 % trypsin (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) and incubated for 6 min at 37 °C. Then, the trypsin was removed and the DRG were washed three times with complete DMEM. Enzymatically digested ganglia were resuspended in 1 ml DMEM [supplemented with 10 % FBS and 1 % penicillin/streptomycin

(Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)] and mechanically dissociated to a homogeneous solution by repeating pipetting with aid of a polished glass pipette. 200 µl of the solution was transferred to 35 mm-culture-dishes, and maintained in a humidified 5 % CO₂ incubator (37 °C) for 4 hours. When completed this period, the culture dishes were filled up to 3 ml of normoglycemic (5.5 mM of glucose) or hyperglycemic (55 mM of glucose) DMEM and kept in the incubator for 24 h.

4.4 Photobiomodulation therapy (PBMT) through low-level laser irradiation (LLLT) and customized optical-fiber system

Immortalized cell cultures (U87, HT22, and NG108-15) and rat DRG afferent neurons on culture dishes were exposed to GaAs 904 nm infrared laser irradiation using an Endophoton LLT-1307 laser device (KLD Biosystems® - Brazil), class IIIB; continuous wave; energy 70 mJ and 2.03 Joule, 1 and 29 seconds, respectively; power ~ 5 mW or ~ 20 mW; 0.001 cm² output beam; 7,000 mW/cm² irradiance. PBMT parameters were based on the used in our former project (FAPESP process no. 2015/12673-5) as well as following the recommendations of the World Association for Laser Therapy (WALT). Laser pulses were applied at specific times during the imaging (time-lapse) by a customized optical-fiber system, specially developed for this project (Figure 1, Panel A; Figure 2, Panels A and B) or the light was directly delivered by the laser probe (placed under the cell culture dishes, at a distance of 1 cm), as illustrated in the Figure 1, Panel B. To measure the final power of delivered light, we used a PM100D digital handheld optical power and energy meter console (Thorlabs, Newton, New Jersey, USA), connected to a S142C Integrating Sphere (Thorlabs, Newton, New Jersey, USA), which works as a sensor for the light energy. The power of the optical-fiber delivered light was kept at about 5 mW and 20 mW for testing the cell responses, by adjusting the light injection, through a micromanipulator, into the optical-fiber.

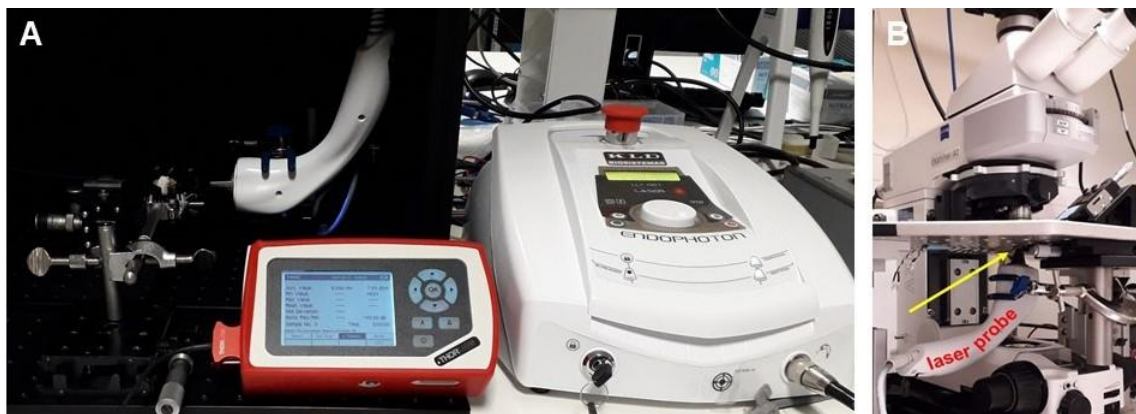


Figure 1. Customized laser set up for PBMT. Panel A shows the optical-fiber customized system developed for the current project. The 904 nm GaAs infrared laser probe, connected to a laser modulator (Endophoton LLT-1307, KLD Biosystems® - Brazil), was precisely hold to assure the light injection into the optical-fiber. Measurements of the delivered light power were performed with aid of a digital handheld optical power and energy meter console. Panel B shows another configuration, without the optical-fiber, in which the laser probe was positioned right under the cell culture dish, and the light was directly applied at a distance of 1 cm far from the cell culture dish bottom (yellow arrow).

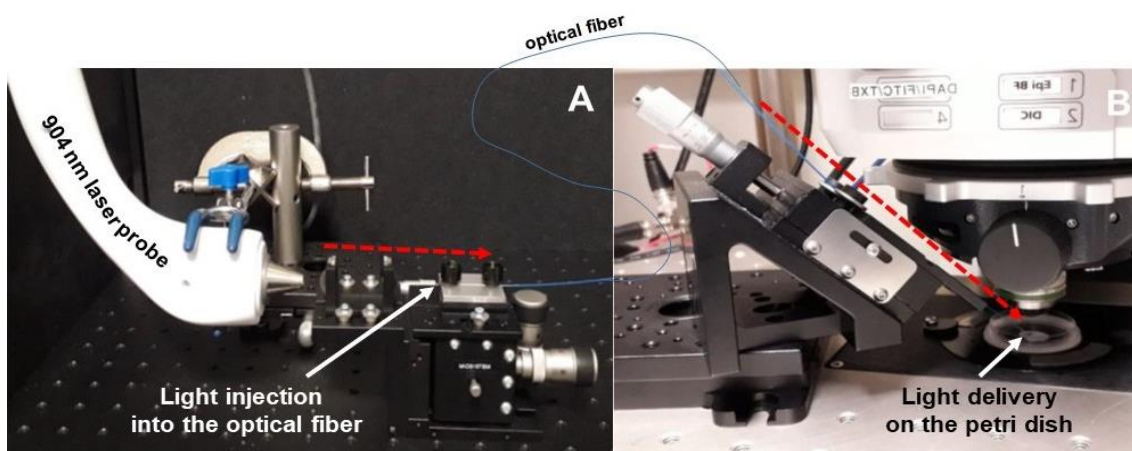


Figure 2. Customized optical-fiber system. Panel A shows the set up for light injection into the optical fiber. A lens set was used for converging the light (dotted red arrow) emitted from the laser probe and its injection into the optical-fiber (white arrow). Micromanipulators assured the adjust of the desired light power (5 mW or 20 mW, for example). Another micromanipulator was used to adjust the distance of the optical-fiber tip from the cells in culture (Panel B, dotted red arrow). The optical-fiber tip was positioned diagonally, at a 45-degree angle, in contact with the cell culture media (white arrow). That configuration allowed the imaging and the application of laser pulses simultaneously, without interference of the microscope excitation laser in the 904 nm infrared laser, and vice-versa.

4.5 Mitochondrial membrane potential (MMP) through tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRE) fluorescence

This analysis was performed using cells loaded with tetramethylrhodamine, ethyl ester (TMRE; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), which is a cell-permeant, cationic, red-orange fluorescent dye, readily sequestered by active mitochondria. After 24 hours of incubation under low (5.5 mM) or high (55 mM) glucose, the DRG afferent neurons were washed with PBS and loaded with 500 nM TMRE diluted in physiological solution (Live Cell Imaging Solution, LCIS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), supplemented with glucose (D-(+) Glucose, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), at the same concentrations of DMEM in which DRG neurons were incubated during 24 hours (5.5 or 55 mM of glucose). TMRE-loaded DRG were maintained in a humidified 5 % CO₂ incubator (37 °C) for 30 minutes.

We also used positive and negative controls of the MMP, which stimulate or inhibit the mitochondrial complexes. The chosen positive control was 2,4-dinitrophenol (DNP, 20 µM; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), a mitochondrial uncoupler. As negative controls we used Rotenone (ROT, 5µM; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), an inhibitor of the mitochondrial complex I, and Antimycin A from *Streptomyces sp.*, (AMA, 5µM; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), an inhibitor of the mitochondrial complex III. Both controls (positive and negatives) were added to the LCIS + TMRE solution and incubated in a humidified 5 % CO₂ incubator (37 °C) for 30 minutes. After incubation, the cell culture dishes were immediately submitted to imaging procedures. The fluorescence was recorded in time-lapse (1 image per second, during 10 minutes), with excitation of 550 nm, exposure time of 500 ms, 2x2 binning and 20x objective lens. PBMT was applied at 3 and 6 minutes of elapsed-time, following the parameters previously described (see item 3.4). The obtained images (stacks) were analyzed with aid of the ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018) software.

4.6 Neuronal membrane potential (FluoVolt™ Membrane Potential Probe)

We chose a next generation, fast-responding voltage-sensitive dye FluoVolt™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) to monitor the optical membrane potential of the DRG afferent neurons. This dye was chosen for its ability to respond to changes in membrane potential in sub-milliseconds with a high magnitude of emission change. The magnitude of potential-dependent fluorescence change of the fast response probes is about 2–10 %

fluorescence change per 100 mV of cell membrane depolarization. After 24 hours of DRG neurons incubation in low- (5.5 mM) or high-glucose (55 mM) (D-(+) Glucose, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) we replaced the media for FluoVolt™ in the physiological solution (Live Cell Imaging Solution, LCIS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) supplemented with the dye (1:1000× in DMSO) and with the PowerLoad™ Concentrate (1:100×), for 30 min in the dark at room temperature. LCIS was previously prepared with 5.5 or 55 mM of glucose (D-(+) Glucose, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), correlating with the same concentrations of DMEM in which DRG neurons were incubated during 24 hours. The PowerLoad™ Concentrate (a component of the FluoVolt™ Kit) is an optimized formulation of pluronic surfactant polyols, which help the solubilization of the dye.

After 30 minutes of FluoVolt™ incubation, the solution was removed and the cells were washed twice with LCIS. 1 ml of LCIS was used for live-cell imaging. Time-lapse imaging consisted of 10 minutes, 1 image per second, with application of 904 nm laser pulses (PBMT) at 3 and 6 minutes, during 1 (70 mJ) or 29 seconds (2.03 J). For FluoVolt™ membrane potential, the laser probe was positioned under the microscope, in a distance of 1 cm far from the cell culture dish bottom. The microscope set up consisted of: 490/500 nm of excitation/illumination; 20x objective lens; 2x2 binning; exposure time of 200 ms; LED intensity of 10 %. Images were acquired using MetaMorph Advanced v.7.7.0.0 (Molecular Devices, Foster City, CA, USA) and analyzed by using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018).

4.7 Whole-cell patch clamp recordings of DRG afferent neurons

Patch clamp recordings on DRG from adult rats were performed according to the protocol described by Gong, Ohara and Jasmin (2016). Patch clamp whole-cell recordings were obtained with a EPC 10 USB Patch clamp amplifier (HEKA Instruments Inc., Holliston, MA, USA). Patch pipettes were prepared using a horizontal puller (MP100; Sutter Instrument, Novato, CA, USA). Use used the following intrapipette solution: KCl 10 mM; Kgluconate 130 mM; HEPES 10 mM; MgCl₂*6H₂O 2 mM; MgATP 2 mM; Na₂GTP 0.5 mM. The pipette resistance was about 6 MΩ once filled with intrapipette solution, and the acquisition was a point every 2.10⁻⁵ s (50 kHz) and 5.10⁻⁵ s (20 kHz).

4.8 Statistical analysis

The comparisons between three or more groups were made by One-way ANOVA, followed by Bonferroni post-hoc test. For comparisons between only two groups, we used unpaired *t-test*. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***) were considered statistically significant. All statistical tests were performed on GraphPad Prism® (GraphPad Software, San Diego, California, USA) versions 5 and 7. Numerical values were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM).

5 RESULTS AND DISCUSSION

5.1 Pilot study on mitochondrial membrane potential (MMP) with U87, HT22, NG108-15 cells, and DRG afferent neurons exposed to PBMT (904 nm) under low- or high-glucose conditions, using TMRE (Tetramethylrhodamine ethyl ester) fluorescence

Initially, to find the working best concentrations of TMRE and the microscope parameters (as a pilot study), we used immortalized tumorous cell lines (U87, HT22, and NG108-15). Cells were plated with conventional cell culture medium (DMEM) according to the protocols for each respective cell line. After cell attaching, the medium was replaced by low- (5.5 mM) or high-glucose (55 mM) DMEM and the cell culture dishes were kept in the incubator for 24 hours. The DMEM was removed and were added 2 ml of 500 nM TMRE and kept for 30 minutes in the incubator (5 % CO₂ at 37 °C). For this initial protocol, we removed the LCIS+TMRE solution at the end of the 30-minutes-incubation. The tested microscope set up was the same for all the cell lines and groups: 550 nm excitation; ~400 ms exposure; 1 image per second during 10 minutes. Infrared laser (904 nm) was applied through the customized optical-fiber system, between the 30th and 59th seconds, total of 29 seconds (dotted black vertical lines) / 2.03 J / ~20 mW power; 20x objective lens; room temperature; LED intensity at 4 %. The term “group” refers to 3-5 35 mm-petri dishes containing about 40 U87 cells; 51.37 HT22 cells; 46.43 NG108-15 cells.

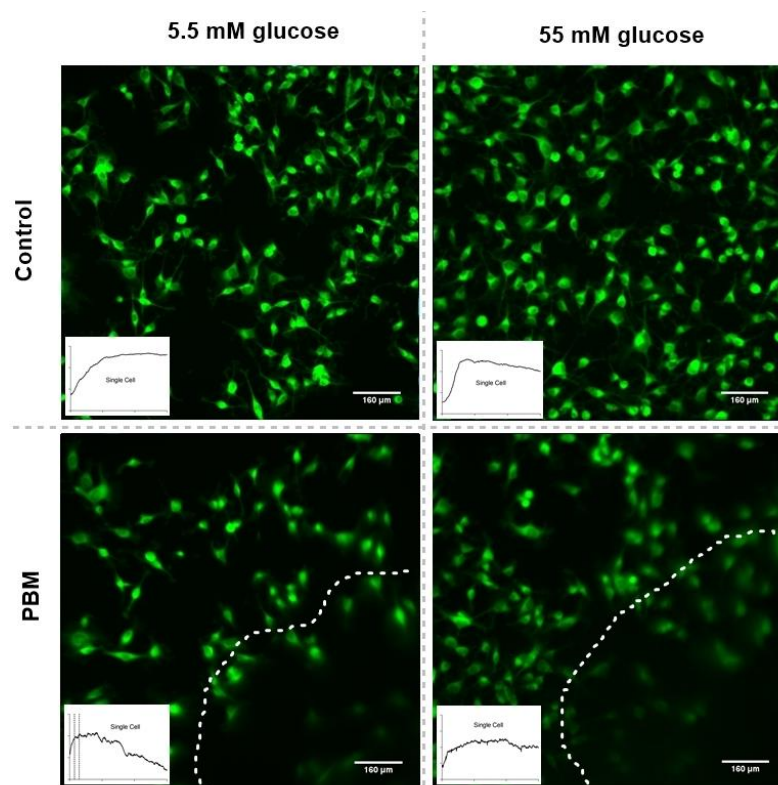


Figure 3. U87 (human glioblastoma) cells incubated under low- (5.5 mM) or high-glucose (55 mM) and exposed to PBMT. Upper (left and right) panels refer to U87 cells incubated under low- (5.5 mM) and high-glucose (55 mM), respectively, during 24 hours (control, without PBMT). Lower panels (left and right) refer to U87 cells incubated under low- (5.5 mM) and high-glucose (55 mM), respectively, during 24 hours and then submitted to PBMT. Dotted white lines refer to altered-focus area due the presence of the optical-fiber tip, on the bottom-right-corners. Small charts on the bottom-left-corners refer to the total intensity of fluorescence (a. u.) of a single U87 cell. Scale bars = 100 μm .

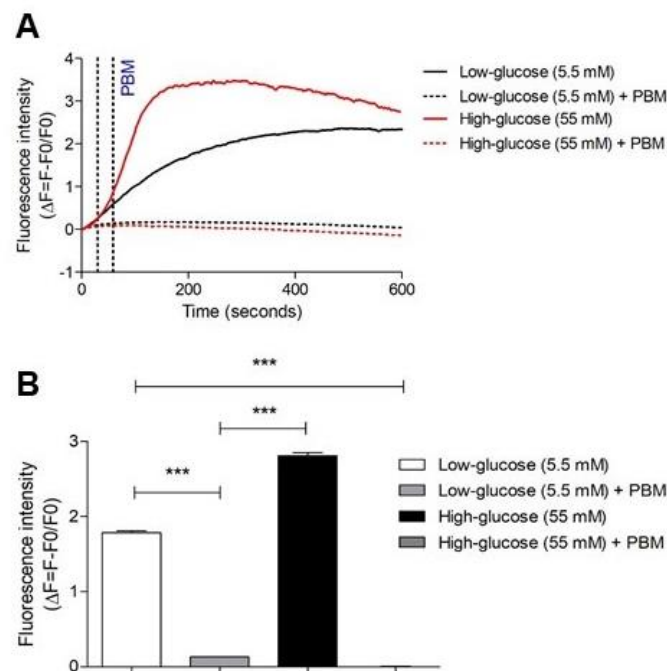


Figure 4. Mitochondrial membrane potential (MMP) of U87 cells under low- or high-glucose and exposed to PBMT. Panel A shows the normalized fluorescence intensity ($\Delta F = (F - F_0)/F_0$) of U87 incubated during 24 hours in low- (5.5 mM) (black line) or high-glucose (55 mM) (red line) and exposed to PBMT through the customized optical-fiber system (904 nm; ~20 mW of delivered light; energy of 2.03 J; 29 seconds) on the interval limited by the vertical black dotted lines. U87 cells in low- or high-glucose and exposed to PBMT showed a reduction in the fluorescence provided by the TMRE dye (black dotted line and red dotted line, respectively), in comparison to the control groups (low- or high-glucose without PBMT). Panel B shows a bar graph of the normalized intensity ($\Delta F = (F - F_0)/F_0$) considering the whole fluorescence during the 10 minutes of elapsed-time. PBMT caused a significant reduction ($p < 0.001$) in the TMRE fluorescence in comparison to control groups, independent of the glucose concentration (5.5 or 55 mM). One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M.; symbol (***) means $p < 0.001$.

U87 cells in low- or high-glucose and exposed to PBMT (904 nm; ~20 mW of delivered light; energy of 2.03 J; 29 seconds) showed a reduction in the fluorescence provided by the TMRE dye, in comparison to the control groups (low- or high-glucose without PBMT) (Figure 4). For the HT22 cells, under high-glucose (55 mM), PBMT caused a significant reduction ($p < 0.001$) in the TMRE fluorescence in comparison to control group. However, in low-glucose (5.5 mM), PBMT caused a slight increase in the MMP related to TMRE fluorescence in HT22 cells, as shown in Figure 6.

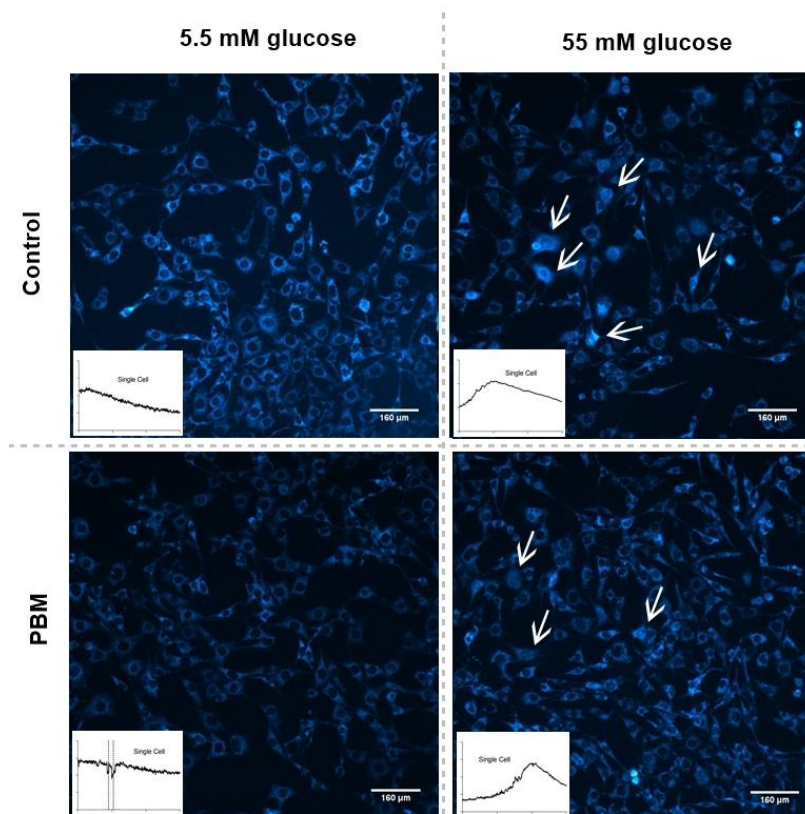


Figure 5. HT22 (mouse hippocampal neurons) cells incubated under low- (5.5 mM) or high-glucose (55 mM) and exposed to PBMT. Upper (left and right) panels refer to HT22 cells incubated under low- (5.5 mM) and high-glucose (55 mM), respectively, during 24 hours (control, without PBMT). Lower panels (left and right) refer to HT22 cells incubated under low- (5.5 mM) and high-glucose (55 mM), respectively, during 24 hours and then submitted to PBMT. Small charts on the bottom-left-corners refer to the total intensity of fluorescence (a. u.) of a single HT22 cell. Scale bars = 100 µm.

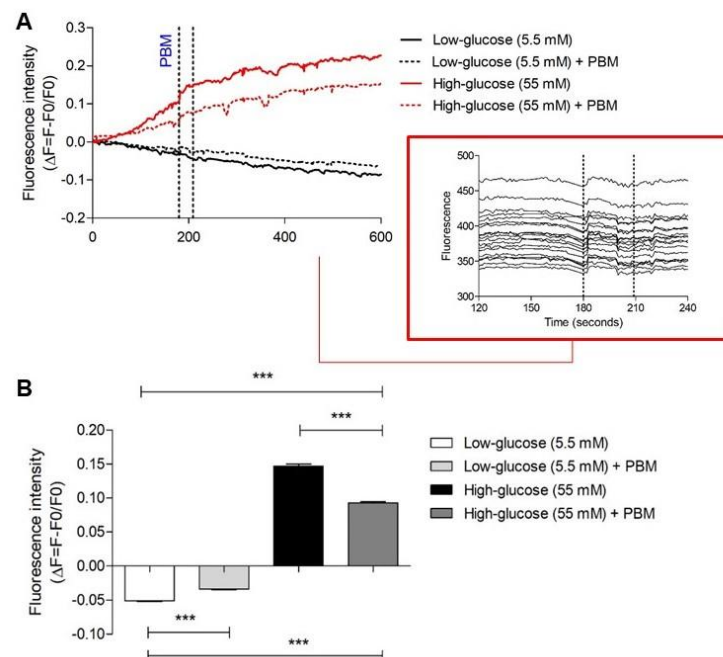


Figure 6. Mitochondrial membrane potential (MMP) of HT22 cells under low- or high-glucose and exposed to PBMT. Panel A shows the normalized fluorescence intensity ($\Delta F=(F-F_0)/F_0$) of HT22 incubated during 24 hours in low- (5.5 mM) (black line) or high-glucose (55 mM) (red line) and exposed to PBMT through the customized optical-fiber system (904 nm; ~20 mW of delivered light; energy of 2.03 J; 29 seconds) on the interval limited by the vertical black dotted lines. HT22 cells in low- or high-glucose and exposed to PBMT showed differences in the fluorescence provided by the TMRE dye (black dotted line and red dotted line, respectively), in comparison to the control groups (low- or high-glucose without PBMT). Red-board box shows a magnification of the total intensity of fluorescence (a. u.) regarding individual cells from the low-glucose group submitted to PBMT. There is an intensity increasing of fluorescence during the 29 seconds laser pulse. Panel B shows a bar graph of the normalized intensity ($\Delta F=(F-F_0)/F_0$) considering the whole fluorescence during the 10 minutes of elapsed-time. Under high-glucose (55 mM), PBMT caused a significant reduction ($p < 0.001$) in the TMRE fluorescence in comparison to control group; in low-glucose (5.5 mM), PBMT caused a slight increase in the MMP related to TMRE fluorescence. One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M.; symbol (***) means $p < 0.001$.

NG108-15 cells (a type of excitable cells), in low- or high-glucose and exposed to PBMT (904 nm; ~20 mW of delivered light; energy of 2.03 J; 29 seconds) showed a reduction in the fluorescence provided by the TMRE dye, in comparison to the control groups (low- or high-glucose without PBMT) (Figure 8). DRG neurons in low- or high-glucose and exposed to PBMT also showed a reduction in the fluorescence provided by the TMRE dye in comparison to the control groups (low- or high-glucose without PBMT), as shown in Figure 10.

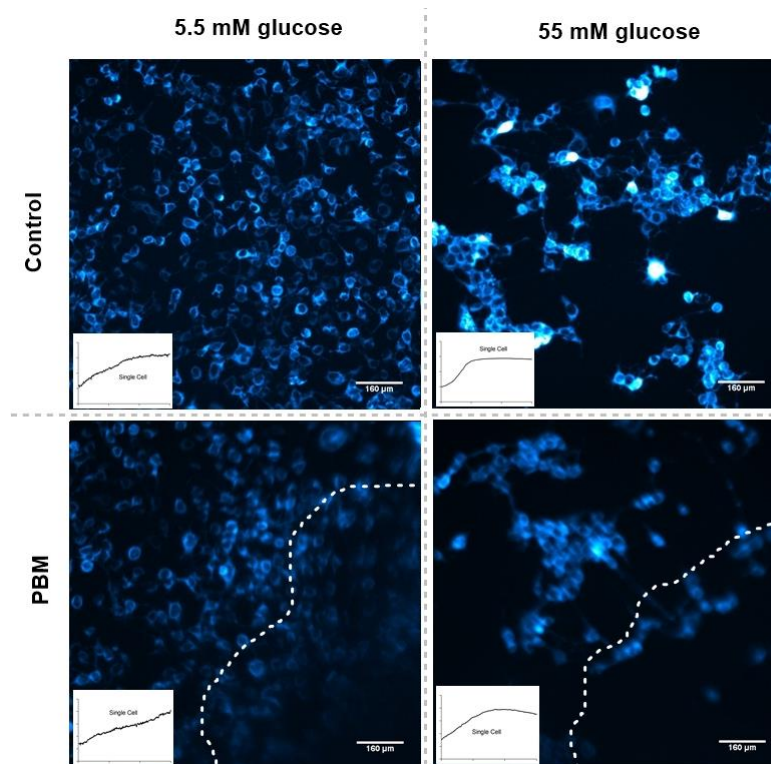


Figure 7. NG108-15 (mouse neuroblastoma x rat glioma hybrid) cells incubated under low- (5.5 mM) or high-glucose (55 mM) and exposed to PBMT. Upper (left and right) panels refer to NG108-15 cells incubated under low- (5.5 mM) and high-glucose (55 mM), respectively, during 24 hours (control, without PBMT). Lower panels (left and right) refer to NG108-15 cells incubated under low- (5.5 mM) and high-glucose (55 mM), respectively, during 24 hours and then submitted to PBMT. Dotted white lines refer to altered-focus area due the presence of the optical-fiber tip, on the bottom-right-corners. Small charts on the bottom-left-corners refer to the total intensity of fluorescence (a. u.) of a single NG108-15 cell. Scale bars = 100 μm.

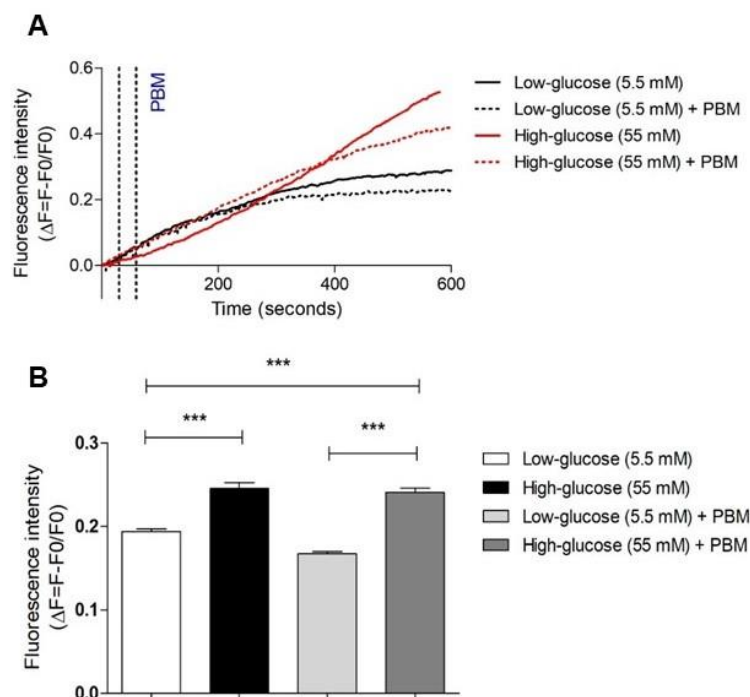


Figure 8. Mitochondrial membrane potential (MMP) of NG108-15 cells under low- or high-glucose and exposed to PBMT. Panel A shows the normalized fluorescence intensity ($\Delta F = (F - F_0)/F_0$) of NG108-15 cells incubated during 24 hours in low- (5.5 mM) (black line) or high-glucose (55 mM) (red line) and exposed to PBMT through the customized optical-fiber system (904 nm; ~20 mW of delivered light; energy of 2.03 J; 29 seconds) on the interval limited by the vertical black dotted lines. NG108-15 cells in low- or high-glucose and exposed to PBMT showed a reduction in the fluorescence provided by the TMRE dye (black dotted line and red dotted line, respectively), in comparison to the control groups (low- or high-glucose without PBMT). Panel B shows a bar graph of the normalized intensity ($\Delta F = (F - F_0)/F_0$) considering the whole fluorescence during the 10 minutes of elapsed-time. PBMT caused a significant reduction ($p < 0.001$) in the TMRE fluorescence in comparison to control groups, independent of the glucose concentration (5.5 or 55 mM). One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M.; symbol (***) means $p < 0.001$.

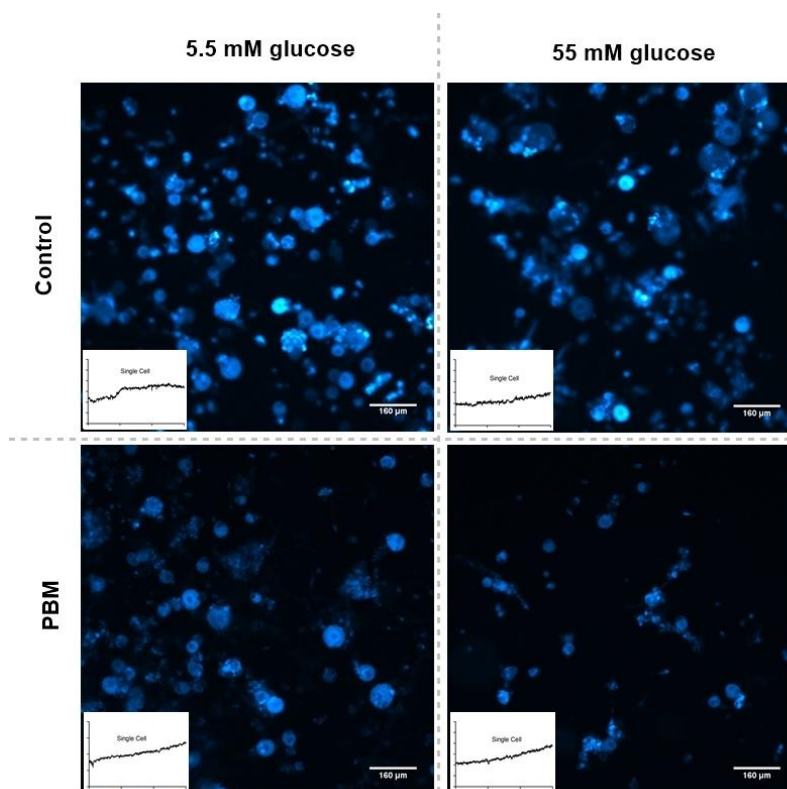


Figure 9. DRG afferent neurons incubated under low- (5.5 mM) or high-glucose (55 mM) and exposed to PBMT. Upper (left and right) panels refer to DRG afferent neurons incubated under low- (5.5 mM) and high-glucose (55 mM), respectively, during 24 hours (control, without PBMT). Lower panels (left and right) refer to DRG afferent neurons incubated under low- (5.5 mM) and high-glucose (55 mM), respectively, during 24 hours and then submitted to PBMT. Small charts on the bottom-left-corners refer to the total intensity of fluorescence (a. u.) of a single DRG neuron. Scale bars = 100 μm.

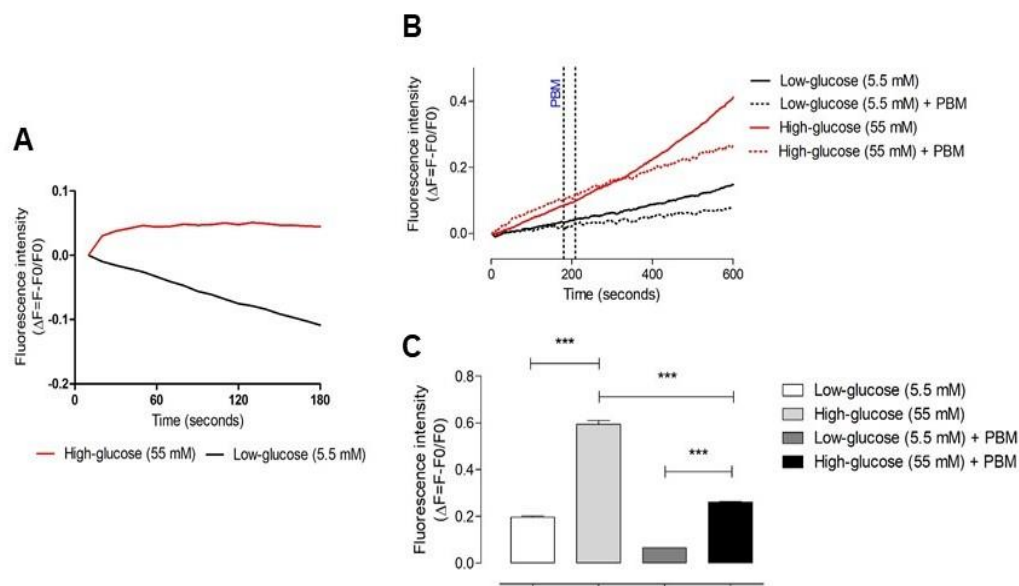


Figure 10. Mitochondrial membrane potential (MMP) of DRG afferent neurons under low- or high-glucose and exposed to PBMT. Panel A shows the influence of the glucose concentration (5.5 or 55 mM) on the fluorescence emitted by TMRE from DRG afferent neurons. The normalized fluorescence intensity ($\Delta F = (F - F_0)/F_0$) of DRG afferent neurons loaded with TMRE after 24 hours under high-glucose (55 mM) is increased over time. Panel B shows the normalized fluorescence intensity ($\Delta F = (F - F_0)/F_0$) of DRG afferent neurons incubated during 24 hours in low- (5.5 mM) (black line) or high-glucose (55 mM) (red line) and exposed to PBMT through the customized optical-fiber system (904 nm; ~20 mW of delivered light; energy of 2.03 J; 29 seconds) on the interval limited by the vertical black dotted lines. DRG neurons in low- or high-glucose and exposed to PBMT showed a reduction in the fluorescence provided by the TMRE dye (black dotted line and red dotted line, respectively), in comparison to the control groups (low- or high-glucose without PBMT). Panel C shows a bar graph of the normalized intensity ($\Delta F = (F - F_0)/F_0$) considering the whole fluorescence during the 10 minutes of elapsed-time. PBMT caused a significant reduction ($p < 0.001$) in the TMRE fluorescence in comparison to control groups, independent of the glucose concentration (5.5 or 55 mM). One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M.; symbol (***) means $p < 0.001$.

5.2 Optimized mitochondrial membrane potential (MMP) experiments with DRG afferent neurons exposed to PBMT (904 nm) under low- or high-glucose conditions, based on TMRE (Tetramethylrhodamine ethyl ester) fluorescence

After the pilot study, we optimized the experiments of MMP assessed on DRG primary afferent neurons incubated in low- or high-glucose concentrations (5.5 and 55 mM, respectively) during 24 hours and exposed to infrared light (904 nm) (PBMT) through an optical fiber device (5 mW or 20 mW, during 1 or 29 seconds, 70 mJ or 2.03 J, respectively). Firstly, we have chosen these PBMT parameters (especially the energy of 2.03 J, applied during 29 seconds) based on their analgesic effects observed in our *in vivo* study, performed

in Brazil, at UNICAMP (FAPESP process no. 2015/12673-5), which was partially published in the Journal of Biophotonics (Vieira *et al.*, 2019).

Secondly, after testing the right parameters for microscopy setting and chemicals concentrations, we decided to keep the TMRE in the extracellular medium during the cell imaging, based on the MMP dynamics. Because of that, we got an inverse result, once the increasing in fluorescence should be proportional to the MMP increasing. Then, PBMT parameters were achieved after a dose-response curve performed with different laser powers (~ 1.5 mW; 5 mW; 10 mW; 15 mW; 20 mW) and times of exposure (1 or 29 seconds; 70 mJ or 2.03 J, respectively) in U87 cells, always keeping the TMRE in the extracellular media (data not shown). All the imaging procedures were done during 10 minutes and the laser pulses were applied at 3 and 6 minutes of elapsed times. The optical-fiber tip was kept as closest as possible of the DRG neurons, without touching them, perpendicularly, in the bottom-right-corner of the field. Graphs were plotted as X-Y axis, composed as Time x $\Delta F=(F-F_0)/F_0$ (normalized).

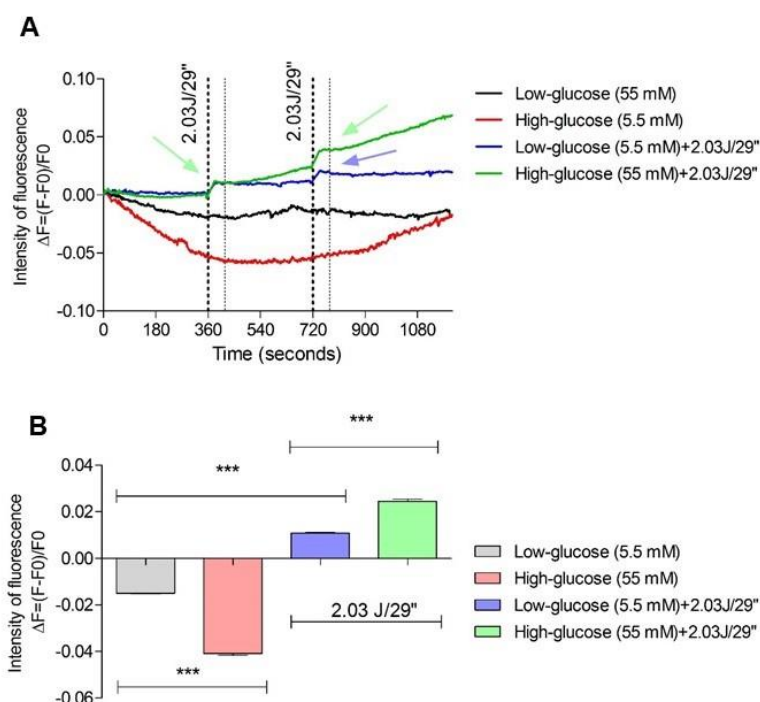


Figure 11. Mitochondrial membrane potential (MMP) of hyperglycemia-stressed DRG afferent neurons exposed to PBMT (904 nm). Panel A shows the normalized fluorescence intensity ($\Delta F=(F-F_0)/F_0$) of DRG afferent neurons incubated during 24 hours in low- (5.5 mM) (black line) or high-glucose (55 mM) (red line) and exposed to PBMT through the customized optical-fiber system (904 nm; ~20 mW of delivered light; energy of 2.03 J; 29 seconds; blue and green lines) during the interval limited by the black-to-gray vertical dotted lines.

Green and blue arrows show slight increases of MMP after starting the laser irradiation (PBMT). Panel B shows a bar graph of the normalized intensity ($\Delta F=(F-F_0)/F_0$) considering the whole fluorescence during the elapsed-time. There was a significant reduction ($p < 0.001$) in the MMP of the DRG neurons incubated in high-glucose (55 mM) in comparison to DRG neurons incubated in low-glucose (5.5 mM). PBMT was able to increase, significantly ($p < 0.001$), the MMP on both low- and high-glucose groups, in comparison to control groups (without laser irradiation). One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test were applied, and the adopted level of significance was 95%. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. Symbol (***) means $p < 0.001$.

According to Chandrasekara *et al.* (2015), hyperglycemia leads to an increasing on the reactive oxygen species (ROS) production by the mitochondria, and the excess of ROS compromises the electron transport chain, specially the complexes I and III, which affects the ATP production on the DRG neurons and, consequently, triggers a degenerative process of the peripheral nerves. This process also affects the Schwann cells metabolism and generates a reduction in the MMP of such cells as well as in the DRG afferent neurons (Delaney *et al.*, 2001; Vincent *et al.*, 2009). Based on that, we investigated whether PBMT effect depends on the activation of mitochondrial complexes, which are affected by the hyperglycemic environment. Thus, we inhibited complexes I and III, by using Rotenone and Antimycin A, respectively.

5.2.1 PBMT effects on mitochondrial membrane potential (MMP) depend on the activation of mitochondrial complexes I and III

As described above, we tested whether the increasing of MMP on DRG neurons under high-glucose (55 mM), mimicking a diabetic condition, is linked to the activation of the mitochondrial complexes I and III. Thus, we inhibited such complexes, I and III, by administration of Rotenone [(ROT, 5 μ M), Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA] and Antimycin-A [from *Streptomyces sp.*, (AMA, 5 μ M), Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA], respectively. As we have expected, the PBMT effect on MMP increasing was reduced after the incubation of DRG with the mitochondrial complexes inhibitors, under low- (5.5 mM) or high-glucose (55 mM), as shown in Figure 12.

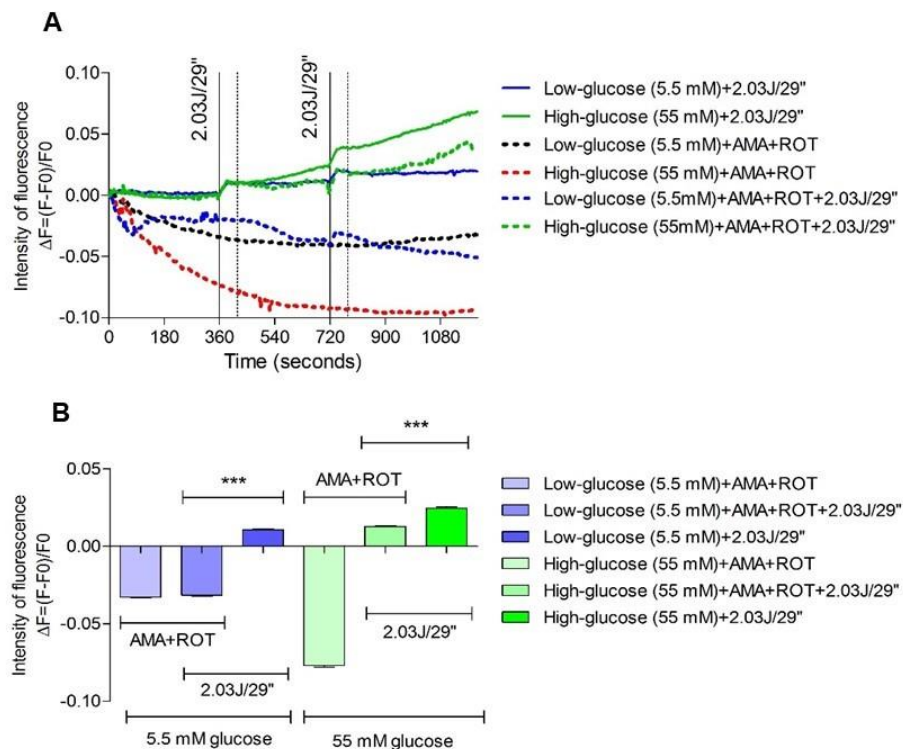


Figure 12. PBMT effects on mitochondrial membrane potential (MMP) of hyperglycemia-stressed DRG afferent neurons depend on activation of mitochondrial complexes I and III. Panel A shows the normalized fluorescence intensity ($\Delta F = (F - F_0) / F_0$) of DRG afferent neurons incubated during 24 hours in low- (5.5 mM) or high-glucose (55 mM) and exposed to PBMT through the customized optical-fiber system (904 nm; ~20 mW of delivered light; energy of 2.03 J; 29 seconds; blue and green lines, respectively) during the interval limited by the black-to-gray vertical dotted lines. Blue and green dotted lines refer to DRG afferent neurons incubated during 24 hours in low- (5.5 mM) or high-glucose (55 mM) and exposed to PBMT plus incubation with the inhibitors of the mitochondrial complexes I and III (ROT and AMA; respectively). Black and red dotted lines refer to DRG neurons under low- or high-glucose plus incubation with the inhibitors of the mitochondrial complexes I and III (ROT and AMA; respectively), without PBMT. Panel B shows a bar graph of the normalized intensity ($\Delta F = (F - F_0) / F_0$) considering the whole fluorescence during the elapsed-time. There was a significant reduction ($p < 0.001$) in the MMP of the DRG neurons under low- or high-glucose incubated with the mitochondrial complexes I and III inhibitors and submitted to PBMT in comparison to those without the inhibitors. One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test were applied, and the adopted level of significance was 95%. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. Symbol (***) means $p < 0.001$.

Differently from our results, Chow et al. (2007) have observed that infrared laser (830 nm) induced the formation of static axonal varicosities in small and medium DRG neurons and induced a progressive and significant decrease in the MMP. However, the authors did not evaluate the influence of the hyperglycemia environment on the MMP of DRG afferent neurons. Besides the MMP, other studies have investigated the inhibition of the slowest

component of action potentials caused by the low-level infrared light (Tsuchiya *et al.*, 1993; 1994). Such action potentials inhibition or hindering possible effects caused by infrared light could be helpful for the treatment of chronic pain, for example. Based on those considerations, next results deal with the effects of PBMT (904 nm) on the neuronal membrane potentials of hyperglycemia-stressed DRG, using FluoVolt™ and patch clamp approaches.

5.3 Neuronal membrane potential (FluoVolt™) of DRG afferent neurons in low- or high-glucose and exposed to PBMT

Tests of neuronal membrane potential through FluoVolt™ were done only with the 904 nm laser probe positioned under the cell culture dish, at a distance of 1 cm, as previously shown in Figure 1, panel B. PBMT was applied with 70 mJ (1 second) or 2.03 J (29 seconds) total energy, on DRG primary afferent neurons incubated in low- (5.5 mM) or high-glucose (55 mM) concentrations during 24 hours. Imaging was done during 10 minutes and the PBMT was applied at 3 and 6 minutes of elapsed-times. Graphs were plotted as X-Y axis, composed as Time X Intensity (a. u.) (total fluorescence) (Figures 13 and 14, Panel A) or Time X $\Delta F = (F - F_0)/F_0$ (normalized) (Figures 13 and 14, Panel B). In addition, bar graphs were plotted considering all the fluorescence (total and normalized, Figures 13 and 14, Panels C and D, respectively) of the respective groups during the 10 minutes.

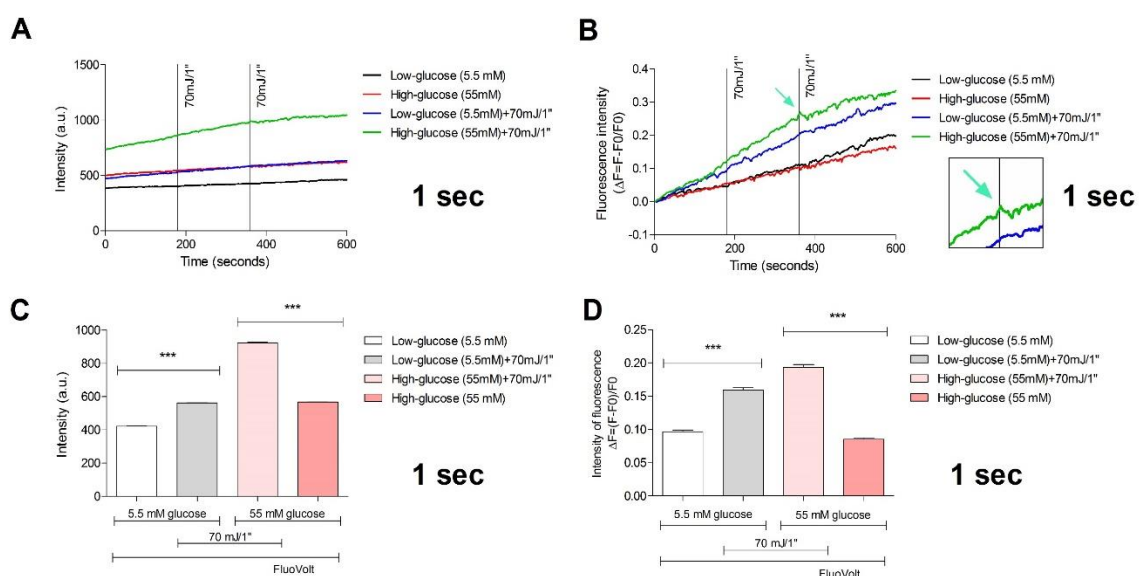


Figure 13. DRG FluoVolt™ neuronal membrane potential and PBMT. Panels A and B show the total fluorescence (a. u.) and the normalized fluorescence ($\Delta F = F - F_0 / F_0$), respectively, related to FluoVolt™ in low-

(black line) and high-glucose (red line) and also after applying the 1 second (70 mJ; 904 nm) laser (blue and green lines). There was an increase of the fluorescence with time for all the groups. Looking at the seconds right after the 1 second pulse (Panel B, green line in magnification) there was a slight decrease in the fluorescence. It short “hyperpolarization” or instantaneous reduction of depolarization could help explain the analgesic effects observed *in vivo*. Panels C and D show the bars related to total and normalized fluorescence, respectively. There were significant differences between low-glucose and low-glucose plus 1-second-pulse ($p < 0.001$), and high-glucose and high-glucose plus 1-second-pulse groups ($p < 0.001$). One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test were applied, and the adopted level of significance was 95%. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. Symbol (***) means $p < 0.001$.

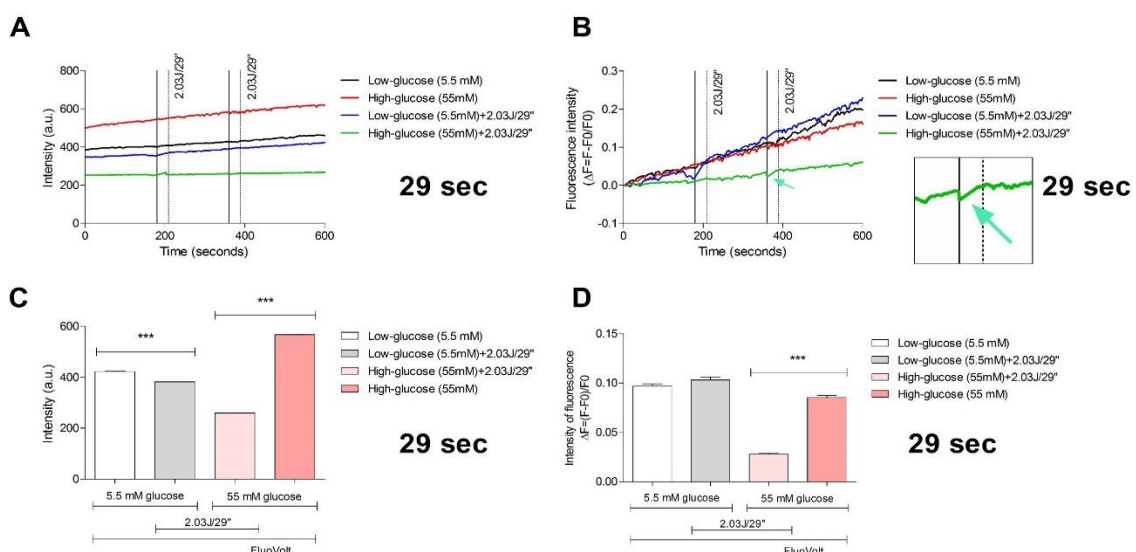


Figure 14. DRG FluoVolt™ neuronal membrane potential and PBMT. Panels A and B show the total fluorescence (a. u.) and the normalized fluorescence ($\Delta F = F - F_0 / F_0$), respectively, related to FluoVolt™ in low- (black line) and high-glucose (red line) and also after applying the 29 seconds (2.03 J; 904 nm) laser (blue and green lines). There was an increase of the fluorescence over time for all the groups, except for high-glucose plus laser irradiation during 29 seconds. Looking at the seconds right after the beginning of the 29-seconds-pulse (panel B, green line in magnification) there was a slight decrease in the fluorescence. It short “hyperpolarization” or instantaneous reduction of depolarization could help explain the analgesic effects observed *in vivo*. The total energy of 2.03 J for 29 seconds of 904 nm laser irradiation are exactly the same parameters used *in vivo*, for the treatment of diabetic neuropathic hyperalgesia (Vieira *et al.*, 2019). Panels C and D show the bars related to total and normalized fluorescence, respectively. There were significant differences between low-glucose and low-glucose plus 29-seconds-pulse ($p < 0.001$, for total fluorescence), and high-glucose and high-glucose plus 29-seconds-pulse groups ($p < 0.001$). One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test were applied, and the adopted level of significance was 95%. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. Symbol (***) means $p < 0.001$.

5.4 Patch clamp of DRG afferent neurons exposed to PBMT

The patch clamp recording technique is a powerful tool for studying the activities of channels or receptors and a great number of studies have been conducted by applying this technique on DRG neurons (Zhang et al., 1999; Dib-Hajj et al., 1999; Cummins et al., 1999). We found out the resting membrane potential (RMP) at around -30 mV. The current of -587 pA was continuously injected to keep the membrane potential at -60 mV, approximately. Figure 15 shows the square current pulses used to find the rheobase, which was found out at 300 pA. Figure 16 shows the membrane potential responses to current pulses.

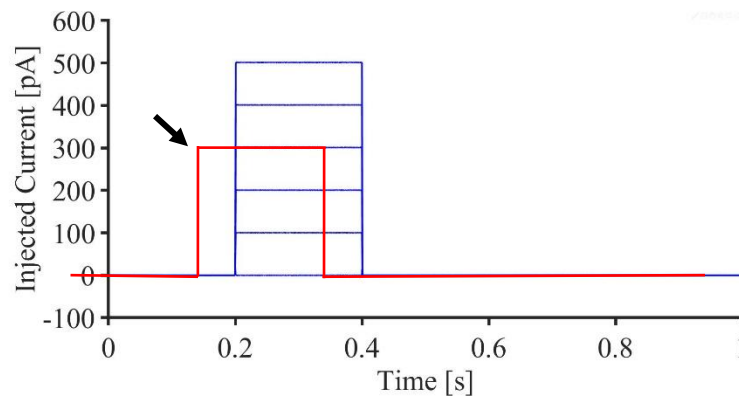


Figure 15. Measurement of neuronal excitability in current clamp mode. Rheobase was measured by injecting a series of currents into the DRG afferent neuron. The lowest current intensity, which can induce an action potential, is defined as rheobase, as indicated by the black arrow. The rheobase for this DRG neuron was 300 pA.

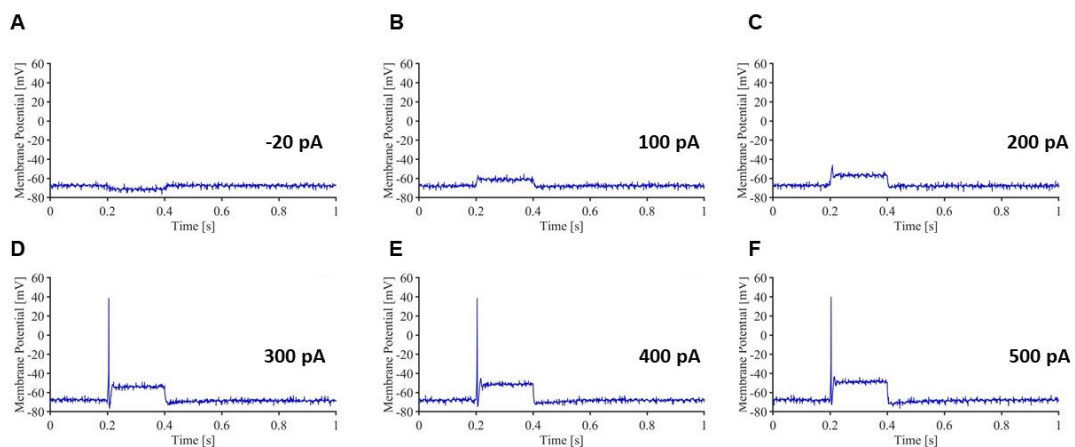


Figure 16. Series of currents injected into the DRG afferent neuron. Panels A-F show the triggered action potentials following injected currents (blue lines), from -20 pA to 500 pA. Rheobase was found out at 300 pA (the lowest current intensity, which can induce an action potential), and its respective action potential is observed in panel D.

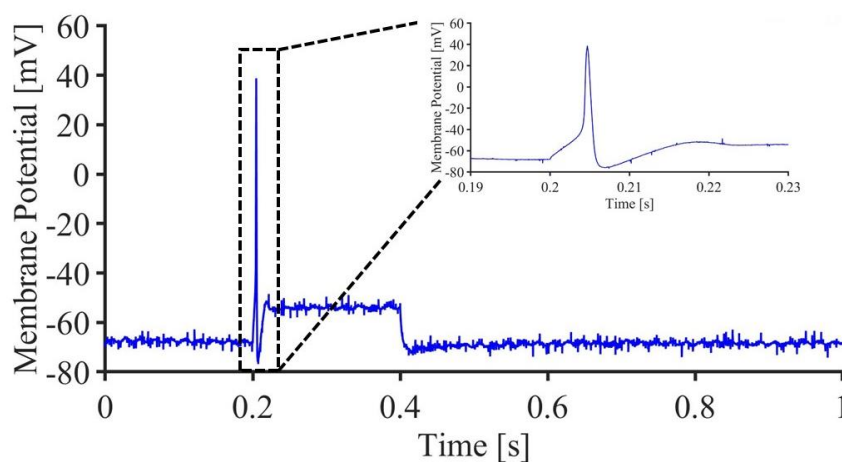


Figure 17. Zoom on the action potential following 300 pA current pulse. Amplitude of the action potential was about 105 mV (with a duration of 5 ms [from the point where it is initiated to the point where the resting membrane potential (RMP) comes back to the basal value, after hyperpolarization]).

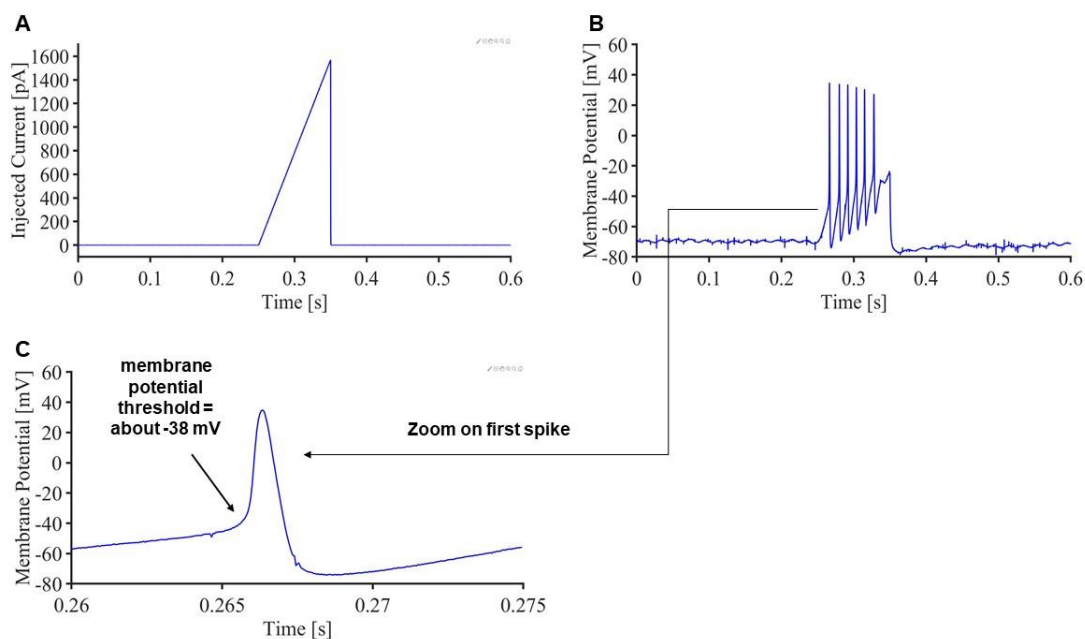


Figure 18. Current ramp to find membrane potential threshold. The membrane threshold was measured by injecting a ramp current (Panel A). The potential, when an action potential is evoked, is defined as membrane threshold. The membrane potential threshold for this neuron was -38 mV (Panels B and C). Panel B shows the first spike found out at -38 mV.

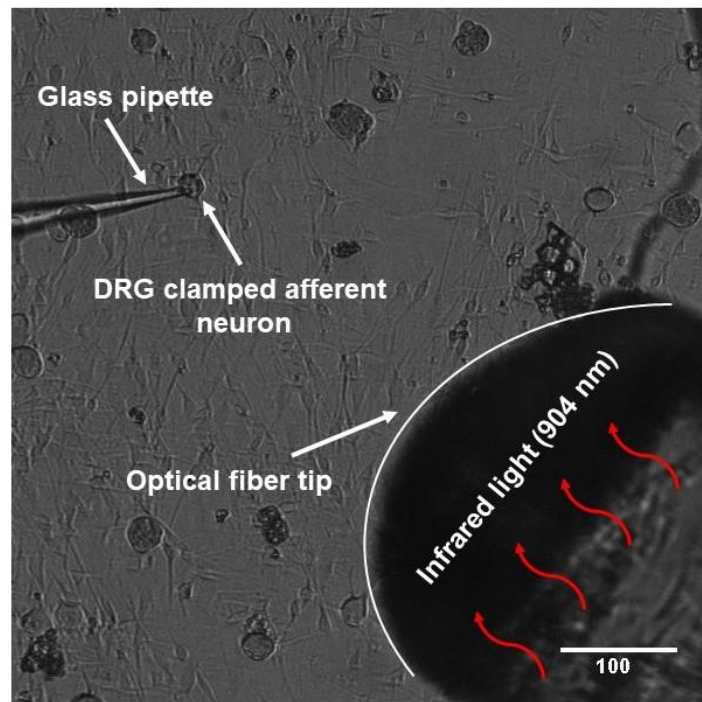


Figure 19. Patch clamp of a DRG afferent neuron simultaneously exposed to PBMT through infrared light (904 nm). DRG neurons were cultured in low- (5.5 mM) or high-glucose (55 mM) and clamped by a glass pipette (upper white arrows). Pipette resistance was about 6 MΩ. PBMT was simultaneously applied through the optical-fiber system. The optical-fiber tip was positioned diagonally at the bottom-right-corner of the field, submersed into the cell medium, without touching the neurons. Infrared light was applied during 1 or 29 seconds, with power of 5 or 20 mW, after about 10 seconds of elapsed-time. Scale bar = 100 μm.

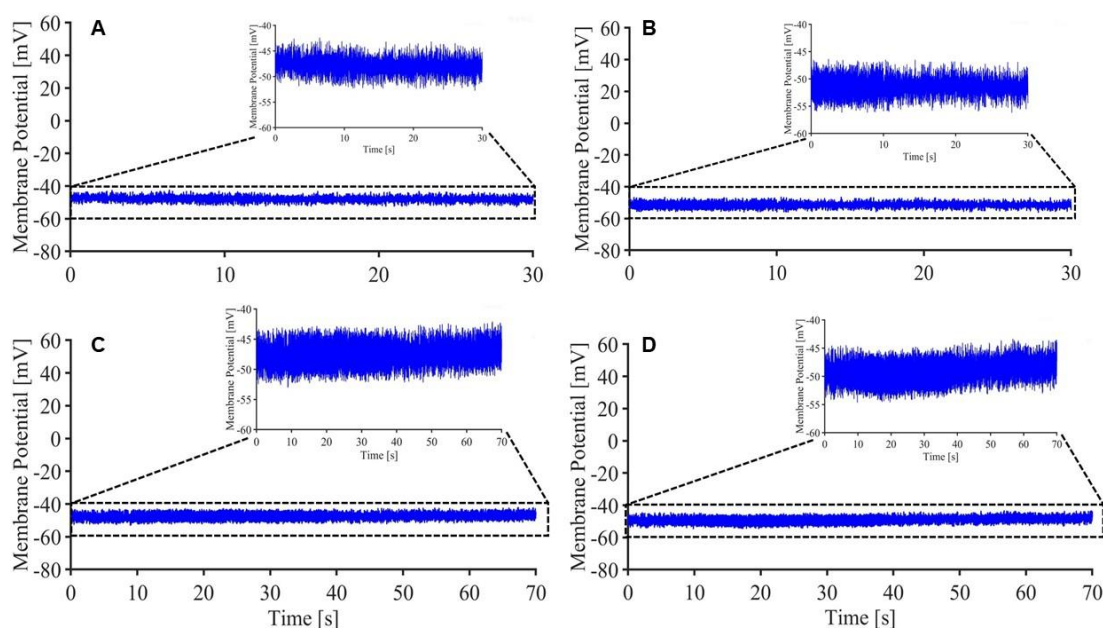


Figure 20. Membrane potential (mV) of DRG afferent neurons measured by patch clamp whole-cell during PBMT application. Panel A shows the membrane potential (mV) of a DRG neuron incubated in high-glucose (55 mM) during 24 hours and exposed to an infrared laser pulse of **1 second, power of 5 mW**. Panel B

shows the membrane potential (mV) of a DRG neuron incubated in high-glucose (55 mM) during 24 hours and exposed to an infrared laser pulse of **1 second, power of 20 mW**. Panel C shows the membrane potential (mV) of a DRG neuron incubated in high-glucose (55 mM) during 24 hours and exposed to an infrared laser pulse of **29 seconds, power of 5 mW**. Panel D shows the membrane potential (mV) of a DRG neuron incubated in high-glucose (55 mM) during 24 hours and exposed to an infrared laser pulse of **29 seconds, power of 20 mW**. Lower blue lines refer to the membrane potential (mV) and the upper-small-graphs inside the panels show the magnification of the membrane potentials. No current injected; the exposition to infrared light (PBMT) was about 10 seconds of elapsed-time. PBMT did not trigger action potentials or caused a hyperpolarization of the DRG neurons after irradiation.

6 CONCLUSIONS

This project was performed to test the hypothesis of the direct influence of PBMT, (delivered through an infrared laser device) on neurons, regarding its mitochondrial and neuronal membrane potentials. This idea rose up after PBMT analgesic effects observed *in vivo*, in a model of diabetic neuropathic hyperalgesia. We have also demonstrated that PBMT was able to reduce the concentration of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in the DRG of diabetic neuropathic rats. The main results of this study show that PBMT application has a positive influence over the altered-mitochondrial membrane potential on hyperglycemia-stressed DRG neurons, which was dependent on the activation of mitochondrial complexes I and III. However, PBMT showed no effect on the neuronal membrane potentials.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP) to provide the main funds for the execution of this project. I am also very grateful to Mines Saint-Étienne (EMSE) and the Department of Bioelectronics (BEL) at the Georges Charpak Campus, Gardanne, France. Especially, I would like to thank my host supervisor, Professor Rodney P. O'Connor, for his acceptance on hosting my project; the Assistant-Professor David Moreau, for all scientific, technical and personal support during this period. In addition, I thank Denise O'Connor for helping me with the DRG collections and all technical support.

REFERENCES

- Akude E, Zhrebetskaya E, Chowdhury SKR, Smith DR, Dobrowsky RT, Fernyhough P. Diminished superoxide generation is associated with respiratory chain dysfunction and changes in the mitochondrial proteome of sensory neurons from diabetic rats. **Diabetes** 2011; 60(1):288-97;
- Arvanitaki A, Chalazonitis N (1961) Excitatory and inhibitory processes initiated by light and infra-red radiations in single identifiable nerve cells (giant nerve cells of *Aplysia*). In **Nervous Inhibition** (Edited by FLOREY E.), pp. 194-231. Pergamon Press, Oxford;
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell** 2009; 139:267-284;
- Bjordal JM, Couppe C, Chow RT, Tuner J, Ljunggren EA. A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. **Aust J Physiother** 2003; 49:107-116;
- Brian PD, Callaghan C, Cheng H, Stables CL, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. **Lancet Neurol** 2014; 11(6): 521–534;
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature** 2001; 414(6865):813-20;
- Byrnes KR, Waynant RW, Ilev IK, Wu X, Barna L, Smith K, Heckert R, Gerst H, Anders JJ. Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury. **Lasers Surg Med** 2005; 36(3):171-185;
- Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, Smith AL, Feldman EL Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. **Lancet Neurol** 2012; 11(6):521-534;
- Chandrasekaran K et al. Mitochondrial transcription factor A regulation of mitochondrial degeneration in experimental diabetic neuropathy. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2015; 309(2):E132–E141;
- Chiang JL, Kirkman MS, Laffel LMB, Peters AL. Type 1 Diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care** 2014; 37(7):2034-2054;
- Chow RT, David MA, Armati PJ. 830 nm laser irradiation induces varicosity formation, reduces mitochondrial membrane potential and blocks fast axonal flow in small and medium diameter rat dorsal root ganglion neurons: implications for the analgesic effects of 830 nm laser. **J Peripher Nerv Syst** 2007; 12:28-39;
- Chow RT, Johnson MI, Lopes-Martins RA, Bjordal JM. Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: A systematic review and meta-analysis of randomized placebo or active-treatment controlled trials. **Lancet** 2009; 374(9705):1897-1908;

Chow RT, Armati P, Laakso EL, Bjordal JM, Baxter GD. Inhibitory effects of laser irradiation on peripheral mammalian nerves and relevance to analgesic effects: a systematic review. **Photomed Laser Surg** 2011; 29(6):365-381;

Chowdhury SKR, Zhrebetskaya E, Smith DR, Akude E, Chattopadhyay S, Jolivald CG, Calcutt NA, Fernyhough P. Mitochondrial respiratory chain dysfunction in dorsal root ganglia of streptozotocin-induced diabetic rats and its correction by insulin treatment. **Diabetes** 2010; 59(4):1082-1091;

Cummins TR, et al. A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in SNS-null and wild-type small primary sensory neurons. **J Neurosci** 1999; 19:RC43;

Delaney CL, et al. Insulin-like growth factor-I and over-expression of Bcl-xL prevent glucose-mediated apoptosis in Schwann cells. **J Neuropathol Exp Neurol** 2001; 60:147–160;

Dib-Hajj SD1, Fjell J, Cummins TR, Zheng Z, Fried K, LaMotte R, Black JA, Waxman SG. Plasticity of sodium channel expression in DRG neurons in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. **Pain** 1999; 83:591-600;

Du Y1, Tang J, Li G, Berti-Mattera L, Lee CA, Bartkowski D, Gale D, Monahan J, Niesman MR, Alton G, Kern TS. Effects of p38 MAPK inhibition on early stages of diabetic retinopathy and sensory nerve function. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2010; 51:2158–2164;

Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. **Pharmacol Ther** 2008; 120:1-34;

Fan N, Donnelly DF, LaMotte RH. Chronic compression of mouse dorsal root ganglion alters voltage-gated sodium and potassium currents in medium-sized dorsal root ganglion neurons. **J Neurophysiol** 2011; 106:3067-3072;

Fan N, Sikand P, Donnelly DF, Ma C, Lamotte RH. Increased Na⁺ and K⁺ currents in small mouse dorsal root ganglion neurons after ganglion compression. **J Neurophysiol** 2011; 106:211-218;

Feldman EL, et al. McGraw Hill. New York, New York, USA. 2002; 771–788;

Feldman EL, Nave K, Jensen TS, Bennett DLH. New horizons in diabetic neuropathy: mechanisms, bioenergetics, and pain. **Neuron** 2017; 93(6):1296-1313;

Fernyhough P, Calcutt NA. Abnormal calcium homeostasis in peripheral neuropathies. **Cell Calcium** 2010; 47(2):130-9;

Gandhi RA, Selvarajah D. Understanding and treating painful diabetic neuropathy: time for a paradigm shift. **Diabet Med** 2015; 32:771-777;

Gigo-Benato D, Russo TL, Tanaka EH, Assis L, Salvini TF, Parizotto NA. Effects of 660 and 780 nm low-level laser therapy on neuromuscular recovery after crush injury in rat sciatic nerve. **Lasers Surg Med** 2010; 42:673-682;

Gong K, Ohara PT, Jasmin L. Patch clamp recordings on intact dorsal root ganglia from adult rats. **J Vis Exp** 2016; 115:54287;

Greene DA, Stevens MJ, Obrosova I, Feldman EL. Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. **Eur J Pharmacol** 1999; 375(1-3):217-223;

Harris K, et al. Adjunctive therapy for glucose control in patients with type 1 diabetes. **Diabetes Metab Syndr Obes** 2018; 11:159-173;

Holanda VM, Chavantes MC, Wu X, Anders JJ. The mechanistic basis for photobiomodulation therapy of neuropathic pain by near infrared laser light. **Lasers Surg Med** 2017; 49:516-524;

Hsieh YL, Chou LW, Chang PL, Yang CC, Kao MJ, Hong CZ. Low-level laser therapy alleviates neuropathic pain and promotes function recovery in rats with chronic constriction injury: possible involvements in hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α). **J Comp Neurol** 2012; 520:2903-2916;

Hsieh YL, Fan YC, Yang CC. Low-level laser therapy alleviates mechanical and cold allodynia induced by oxaliplatin administration in rats. **Support Care Cancer** 2015; 24(1):233-242;

Ishii DN, Lupien SB. Insulin-like growth factors protect against diabetic neuropathy: effects on sensory nerve regeneration in rats. **J Neurosci Res** 1995; 40(1):138–144;

Jensen TS, Finnerup NB. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. **Lancet Neurol** 2014; 13(9):924-935;

Juranek J, Ray R, Banach M, Rai V. Receptor for advanced glycation end-products in neurodegenerative diseases a bad reputation. **Rev Neurosci** 2015; 26(6):691-698;

Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL. Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. **J Clin Invest** 1997; 100(1):115-126;

Lee AYW, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. **FASEB J** 1999; 13(1):3-30;

Liebert AD, Chow RT, Bicknell BT, Varigos E. Neuroprotective effects against POCD by photobiomodulation: evidence from assembly/disassembly of the cytoskeleton. **J Exp Neurosci** 2016; 10:1-19;

Mochizuki-Oda N, Kataoka Y, Cui Y, Yamada H, Heya M, Awazu K. Effects of near-infrared laser irradiation on adenosine triphosphate and adenosine diphosphate contents of rat brain tissue. **Neurosci Lett** 2002; 323(3):207-210;

-
- Peplow PV, Chung TY, Ryan B, Baxter GD. Laser photo-biomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: A review of human and animal studies. **Photomed Laser Surg**. 2011; 29(5):285-304;
- Pop-Busui R, Sima A, Stevens M. Diabetic neuropathy and oxidative stress. **Diabetes Metab Res Rev** 2006; 22(4):257–273;
- Rochkind S, Geuna S, Shainberg A. Chapter 25: Phototherapy in peripheral nerve injury: effects on muscle preservation and nerve regeneration. **Int Rev Neurobiol** 2009; 87:445-464;
- Ryu JJ, Yoo S, Kim KY, Park JS, Bang S, Lee SH, Yang TJ, Cho H, Hwang SW. Laser modulation of heat and capsaicin receptor TRPV1 leads to thermal antinociception. **J Dent Res** 2010; 89(12):1455-1460;
- Satoh J, Yagihashi S, Toyota T. The possible role of tumor necrosis factor- α in diabetic polyneuropathy. **Exp Diabetes Res** 2003; 42(2):65–71;
- Schreiber AK, Nones CFN, Reis RC, Chichorro JG, Cunha JM. Diabetic neuropathic pain: physiopathology and treatment. **World J Diabetes** 2015; 6(3): 432–444;
- Takhtfooladi MA, Jahanbakhsh F, Takhtfooladi HA, Yousefi K, Allahverdi A. Effect of low-level laser therapy (685 nm, 3 J/cm²) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. **Lasers Med Sci** 2015; 30(3):1047-1052;
- Thornalley PJ. Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. **Int Rev Neurobiol** 2002; 50:37-57;
- Tomlinson DR, Gardiner NJ. Diabetic neuropathies: components of etiology. **J Peripher Nerv Syst** 2008; 13(2):112-21;
- Truini A, Garcia-Larrea L, Cruccu G. Reappraising neuropathic pain in humans — how symptoms help disclose mechanisms. **Nat Publ Gr** 2013; 9(10):572-582;
- Tsuchiya D, Kawatani M, Takeshige C. Laser irradiation abates neuronal responses to nociceptive stimulation of rat paw skin. **Brain Res Bull** 1994; 43:369–374;
- Tsuchiya D, Kawatani M, Takeshige C, Sato T, Matsumoto I. Diode laser irradiation selectively diminishes slow component of axonal volleys to dorsal roots from the saphenous nerve in the rat. **Neurosci Lett** 1993; 161:65–68;
- Vieira WF, Kenzo-Kagawa B, Cogo JC, Baranauskas V, Cruz-Höfling MA. Low-level laser therapy (904 nm) counteracts motor deficit of mice hind limb following skeletal muscle injury caused by snakebite-mimicking intramuscular venom injection. **PLoS One** 2016; 11(7):e0158980;
- Vieira WF, Kenzo-Kagawa B, Britto MHM, Ceragioli HJ, Sakane KK, Baranauskas V, da Cruz-Höfling MA. Vibrational spectroscopy of muscular tissue intoxicated by snake venom and exposed to photobiomodulation therapy. **Lasers Med Sci** 2018; 33(3):503-512;

Vieira WF, Magalhães SF, Farias FH, Thomaz AA, Parada CA. Raman spectroscopy of dorsal root ganglia from streptozotocin-induced diabetic neuropathic rats submitted to photobiomodulation therapy. **J Biophotonics** 2019; e201900135;

Vincent AM, Kato K, McLean LL, Soules ME, Feldman EL. Sensory neurons and Schwann cells respond to oxidative stress by increasing antioxidant defense mechanisms. **Antioxid Redox Signal** 2009; 11(3):425–438;

von Leden RE, Cooney SJ, Ferrara TM, Zhao Y, Dalgard CL, Anders JJ, Byrnes KR. 808 nm wavelength light induces a dose-dependent alteration in microglial polarization and resultant microglial induced neurite growth. **Lasers Surg Med** 2013; 45(4):253-263;

WALT. WALT recommended treatment doses x LLLT. 2010; Available from: http://waltza.co.za/wpcontent/uploads/2012/08/Dose_table_904nm_for_Low_Level_Laser_Therapy_WALT-2010.pdf;

Waterhouse NJ, Trapani JA. A new quantitative assay for cytochrome c release in apoptotic cells. **Cell Death Differ** 2003; 10(7):853–855;

Waterhouse NJ, Goldstein JC, von Ahsen O, Schuler M, Newmeyer DD, Green DR. Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. **J Cell Biol** 2001; 153(2):319–328;

Waterhouse NJ, Sedelies KA, Sutton VR, Pinkoski MJ, Thia KY, Johnstone R, Bird PI, Green DR, Trapani JA. Functional dissociation of $\Delta\Psi_m$ and cytochrome c release defines the contribution of mitochondria upstream of caspase activation during granzyme B-induced apoptosis. **Cell Death Differ** 2006; 13:607–618;

Wright DE, Ryals JM, McCarson KE, Christianson JA. Diabetes-induced expression of activating transcription factor 3 in mouse primary sensory neurons. **J Peripher Nerv Syst** 2004; 9:242-254;

Yagihashi S, Mizukami H, Sugimoto K. Mechanism of diabetic neuropathy: where are we now and where to go?" **J Diabetes Investig** 2011; 2(1):18–32;

Yamagishi S, Ogasawara S, Mizukami H, Yajima N, Wada R. Correction of protein kinase C activity and macrophage migration in peripheral nerve by pioglitazone, peroxisome proliferator activated-c-ligand, in insulin-deficient diabetic rats. **J Neurochem** 2008; 104:491–499;

Yan LJ. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. **J Diabetes Res** 2014; 2014:137919;

Younger DS, Rosoklija G, Hays AP, Trojaborg W, Latov N. Diabetic peripheral neuropathy: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of sural nerve biopsies. **Muscle Nerve** 1996; 19(6):722-727;

Zhang JM, Song XJ, LaMotte RH. Enhanced excitability of sensory neurons in rats with cutaneous hyperalgesia produced by chronic compression of the dorsal root ganglion. **J Neurophysiol** 1999; 82:3359-3366;

Zhang H et al. Altered functional properties of satellite glial cells in compressed spinal ganglia. **Glia** 2009; 57:1588-1599;

Zochodne DW, Ramji N, Toth C. Neuronal targeting in diabetes mellitus: a story of sensory neurons and motor neurons. **Neuroscientist** 2008; 14:311-313;

FINAL REPORT APPENDIX

Appendix 6.1



Effects of photobiomodulation therapy through low-level laser irradiation (904 nm) in streptozotocin (STZ)-induced peripheral diabetic neuropathy.

Authors: Willians Fernando Vieira; Silviane Fernandes de Magalhães; Kauê Franco Malange; Gilson Gonçalves dos Santos; Júlia Borges Paes Lemes; André Alexandre de Thomaz; Carlos Amilcar Parada.

Background: Peripheral diabetic neuropathy (PDN) could be associated with declines in motor compound action potential and abnormalities in plantar pressure during gait. PDN was also related to the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) in response to extracellular stimulus, such as TNF- α and IL-1 β interleukins. Due to be a high complexity syndrome, PDN still untreated. Efficacy of photobiomodulation therapy (PBMT) in painful clinical conditions has been established by several recent studies, but there is few information about the effects of PBMT in PDN treatment.

Purpose: Verify the pain relief potential and possible mechanisms of PBMT through low-level laser irradiation (904 nm) in streptozotocin (STZ)-induced diabetic neuropathic rats.

Methods: Experiments were approved by UNICAMP Ethic's Committee (CEUA #3902-1). Male Lewis rats (200-250 g; 6-8-weeks-old) received 5x STZ-low doses (25 mg/kg). Diabetic animals (≥ 250 mg/dL blood glucose) were submitted to von Frey and CatWalk tests at 0, 7, 14, 21, 24, and 28 days after injections. Once neuropathic, rats were submitted to daily PBMT through low-level laser irradiation (GaAs 904 nm; 2.03 Joule; 70 mW; 29 seconds) at the region between L4/L5 dorsal root ganglia (DRG). At the 28th day, irradiated DRG were collected and used to ELISA, real-time RT-qPCR, immunofluorescence, and Raman spectroscopy assays.

Results: PBMT was able to reduce the intensity of hyperalgesia (Δ withdrawal threshold, g) of PDN rats. We detected alterations in CatWalk spatial gait parameters of PDN animals, which were strongly correlated with withdrawal thresholds. Such spatial parameters were counteracted by PBMT at 28 days after STZ injections. PBMT decreased TNF- α and IL-1 β levels, and p38-MAPK mRNA expression. PDN induced the activation of phosphorylated p38-MAPK and this activation was partially prevented by PBMT. Three characteristic peaks of DRG tissue were identified: 2850 cm^{-1} , 2885 cm^{-1} , and 2940 cm^{-1} , whose assignments are CH_2/CH_3 symmetric stretch of lipids, CH_2/CH_3 asymmetric stretch of lipids and proteins, and C-H vibrations in lipids and proteins, respectively. DRG from PDN rats showed an increase in the normalized intensity of 2850 cm^{-1} and 2885 cm^{-1} peaks. These same peaks had their altered intensity reduced by PBMT.

Conclusions: PBMT was able to reduce hyperalgesia in STZ-induced diabetic neuropathic rats and ameliorate spatial gait parameters. In addition, PBMT reduced the p38-MAPK expression linked to the presence of pro-inflammatory interleukins. Raman spectroscopy was able to diagnose spectral alterations in DRG of STZ-induced diabetic neuropathic animals and the positive influence of PBMT over such alterations.

Implications: Innovative topical therapeutic approaches to be used with anti-hyperalgesic purposes are of interest. A better understanding of PBMT effects in STZ-induced diabetic neuropathy is therefore of particular interest since the physical therapists may help to minimize the severity of painful states with a typical and accessible therapeutic resource.

Keywords: PBMT, laser irradiation, diabetic neuropathy, MAPK.

Funding Acknowledgements: This work was funded by FAPESP (Sao Paulo Research Foundation, Process 2015/12673-5; 2018/05108-8; and 2014/25153-7) and CAPES (Coordination of Improvement of Higher Education Personnel).

Appendix 6.2



Photobiomodulation therapy (904 nm) as an alternative treatment to peripheral diabetic neuropathy: *in vivo* and *in vitro* assessments.

Vieira, WF^{1,2}; Nishijima, CM¹ ; Moreau, D²; O'Connor, RP²; Parada, CA¹.

¹Laboratory for Pain Studies, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), 13083-864, Campinas, Brazil; ²Mines Saint-Etienne, Centre CMP, Department of Bioelectronics, 13541, Gardanne, France.

Background and aims: Diabetic neuropathy is a complex syndrome, which affects peripheral nerves and culminates in mechanical hyperalgesia. Hyperglycemia-induced oxidative stress leads to neuronal damage through the formation of free radicals, reactive oxygen species, and mitochondrial failure. Efficacy of photobiomodulation therapy (PBMT) on painful clinical conditions has been established by several studies. We verified the pain relief potential of PBMT on diabetic neuropathic rats and investigated *in vitro* potential mechanisms. **Methods:** Experiments were approved by UNICAMP's Ethic Committee (#3902-1). Male Lewis rats received five streptozotocin (STZ) low-doses (Sigma-Aldrich®, 25 mg/kg) and were submitted to electronic von Frey test at 0, 7, 14, 21, 24 and 28 days after STZ injections. After the 21st day, rats were submitted to daily PBMT (GaAs 904 nm; 2.03 Joule; 70 mW; 29'') at the region between L4/L5 dorsal root ganglia (DRG). In addition, primary cell cultures of DRG were kept at low (5.5 mM) or high glucose (55 mM) for 24 h and exposed to PBMT. To measure the calcium influx, neurons were loaded with FLUO 4-AM (Invitrogen™, USA); Tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) (Invitrogen™, USA) was used for measure the mitochondrial membrane potential (MMP). **Results:** PBMT was able to reduce the hyperalgesia at the 24th and 28th days. After stimulus with 15 mM KCl, DRG neurons previously exposed to PBMT showed a reduced fluorescence related to calcium influx. PBMT also showed influence over altered-MMP on hyperglycemia-stressed DRG neurons. **Conclusions:** PBMT could be used as a coadjuvant tool for the treatment of diabetic neuropathic pain.

Apêndice 7

Title: Gait analysis correlates mechanical hyperalgesia in a model of streptozotocin-induced diabetic neuropathy: a CatWalk dynamic motor function study

Running title: Gait alterations correlate pain

Willians Fernando Vieira¹; Silviane Fernandes de Magalhães¹; Kauê Franco Malange¹; Gilson Gonçalves dos Santos^{1,2}; Maria Alice da Cruz-Höfling³, Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira¹, and Carlos Amilcar Parada^{1*}

¹Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP) – Campinas, Sao Paulo, Brazil;

²Department of Anesthesiology, University of California (UCSD) – San Diego, La Jolla, United States;

³Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP) – Campinas, Sao Paulo, Brazil.

*Corresponding author. Full postal address: Laboratory for Pain Studies, Carl von Linnaeus n/n, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas – Brazil, ZIP Code 13083-864. E-mail: caparada@unicamp.br

Abstract

Background and aims: Peripheral neuropathy is a complication of diabetes commonly associated with pain and decline in motor compound action potential, leading to alterations in plantar pressure during gait. We identified motor impairments in streptozotocin (STZ)-induced diabetic neuropathic rats and correlated with mechanical withdrawal thresholds, establishing this correlation as a complementary method to investigate the development of chronic hyperalgesia in diabetic neuropathy. **Methods:** UNICAMP's Ethics Committee (protocol number 3902-1) approved all experiments. Male Lewis rats (200-250 g) received a STZ-low-dose (25 mg/kg/day) (STZ group) or 0.1 M sodium citrate buffer (SCB, control group) once a day, during five consecutive days. Diabetic rats (250 mg/dL blood glucose) were submitted to electronic von Frey and CatWalk tests at 0, 7, 14, 21, and 28 days after treatment. **Results:** STZ, but not SCB, induced diabetes. After the 14th day (STZ)-induced diabetic rats showed mechanical hyperalgesia and a reduction in the hind limbs footprint intensities. At the 28th day, rats showed alterations in spatial parameters (Maximum Contact Area; Stride Length; Print Area). Those parameters showed a strong correlation with mechanical withdrawal thresholds ($r^2 = 0.97$; 0.99, and 0.93, respectively). **Interpretation:** Correlation between gait parameters and mechanical withdrawal thresholds enables a better

experimental approach to evaluate the development of chronic hyperalgesia in the STZ-induced diabetes model. It allows a concise crosstalk of motor and sensorial functions, which are usually analyzed individually. CatWalk gait parameters can be used as a complementary tool to investigate the development of hyperalgesia in STZ-induced diabetic neuropathic rats.

Keywords: diabetic neuropathy; mechanical hyperalgesia; gait analysis; von Frey test; CatWalk.

Introduction

Several animal models are used to study neuropharmacological pain mechanisms, including inflammatory and chronic pain, such as the peripheral neuropathies. The most common finding in these models of painful neuropathies are mechanical hyperalgesia and allodynia (Campbell; Meyer, 2006). In rats, the mechanical hyperalgesia and mechanical allodynia can be assessed by determining the reflex-response threshold to a defined painful or non-painful mechanical stimulus, respectively. These assessments are usually measured with a series of increasingly stiff von Frey filaments (Chaplan et al., 1994), or by an electronic pressure-meter (electronic von Frey) (Cunha et al., 2004), which are considered as gold standard techniques to diagnose the intensity of pain in nonverbal individuals (Coulthard et al., 2003).

Generally, peripheral neuropathies involve a complex pathogenesis of both sensory and motor peripheral nerves (Zochodne, 1996; Wright et al., 2005). In diabetic humans, the resultant pain from peripheral nerve damage caused by hyperglycemia, induces the development of postural impairment, muscle debility, balance instability and falls, all together a threatening for walking performance (Alam et al., 2017). In this sense, previous studies demonstrated that peripheral diabetic neuropathy could be also associated with alterations in motor compound action potential and neuromuscular junction, reflecting in abnormal foot positioning and lower plantar pressure during the gait (Zhochodne et al., 2008; Schwartz et al., 2008; Benitez et al., 2015). A cue for explaining such biomechanical deficit arouse from research in diabetic mice showing loss and/or degeneration of axons coming from the dorsal root ganglia (DRG) neurons and projecting distally to the hind limbs (Hamers et al., 2001; Coulthard et al., 2003).

In a previous study, Coulthard and colleagues (2002) proposed that changes in gait could be used as an additional evaluation of the chronic pain in arthritic rats. Likewise, it was assumed that an increased sensitivity to mechanical stimuli, as a result of chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve, cause the animal to exert less pressure on the affected limb

during walking, minimizing the paw contact with the floor (Vrinten; Hamers, 2003). Thus, in light of these appointments, we hypothesized that gait analysis could represent an interesting complementary method to verify functional alterations linked to diabetic hyperalgesia.

The CatWalk motor function analysis apparatus consists in an automated tool that quantifies static and dynamic parameters related to each individual paw, during a spontaneous animal walk along a glass-floor walkway (Hamers et al., 2001; Coulthard et al., 2003; Vrinten; Hamers, 2003; Gabriel et al., 2007; Ferreira-Gomes et al., 2008; Chiang et al., 2014; Ängeby Möller et al., 2012; Vieira et al., 2016; Guy et al., 2019). On CatWalk, measurements of gait parameters are performed in non-restrained and freely moving animals, with minimal intervention, thus reducing the potentially confounding effects of stress (Ren, 1999; Vrinten; Hamers, 2003).

Considering that the correlation between sensorial and motor functions can be an adjunctive tool to predict partly the degree of disability of upper or lower limbs, the aim of this study was to identify alterations of the motor biomechanics through the analysis of dynamic and static gait changes in a streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat model. Altered gait parameters were correlated with mechanical withdrawal thresholds measured by electronic von Frey test. The evolution of gait disability and hyperalgesia were followed at 0, 7, 14, 21, and 28 days' time frame, thus indicating a permanent or adaptable condition to the diabetic setting.

Materials and Methods

Ethics statement and rats

All experiments were approved by the institutional Ethics Committee (CEUA-UNICAMP, number 3902-1) and were done in accordance with the ethical guidelines of the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and the International Association for Study of Pain (IASP) guidelines for the animal care and handling procedures on pain research (Zimmerman, 1983). All animal experiments comply with the ARRIVE guidelines and were carried out in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised 1996. Male Lewis rats (LEW/HsdUnib, Harlan, USA, 1996), 6-8-week-old and weighing 200-250 g, were provided by the University's Multidisciplinary Center for Biological Research (CEMIB-UNICAMP). The use of rats was kept to a minimum and they were maintained in plastic cages in number of four, at room standard conditions of

temperature and humidity under 12-12 h dark/light cycle. They received water and food *ad libitum*.

Streptozotocin injections and blood glucose assessment

Rats ($n = 8$) received a Streptozotocin (STZ)-low dose (25 mg/kg/day) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) diluted in 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.5), intraperitoneally (i. p.), once a day during five consecutive days, always at the same period of the day. Control group (SCB, $n = 7$) received the same volume (50.0 - 62.5 μL) of vehicle (the experimental design is presented in Fig. 1). The STZ-multiple-doses protocol has been chosen because it had a better representation of the type-1 diabetes mellitus seen in humans, given it leads to both a progressive destruction of pancreatic islet β -cells and drastic destruction of insulin production (Furman, 2015). To access the mid-morning blood glucose concentrations, rats from both groups (STZ and SCB) had their blood samples collected from the tail vein and the measurements were done by the Accu-Chek Sensor Comfort (Roche Diagnostics®, Germany), with aid of test strips impregnated with glucose oxidase. Diabetes was clinically considered when the rats reached a minimum of 250 mg/dL blood glucose for two consecutive days. The glycemia was measured at 0, 7, 14, 21, and 28 days after starting the STZ or SCB injections. During the five-day-STZ diabetes induction, measurements also were done daily, to confirm the rising in blood glucose levels. Insulin treatment was not given to the rats throughout the experimental period.

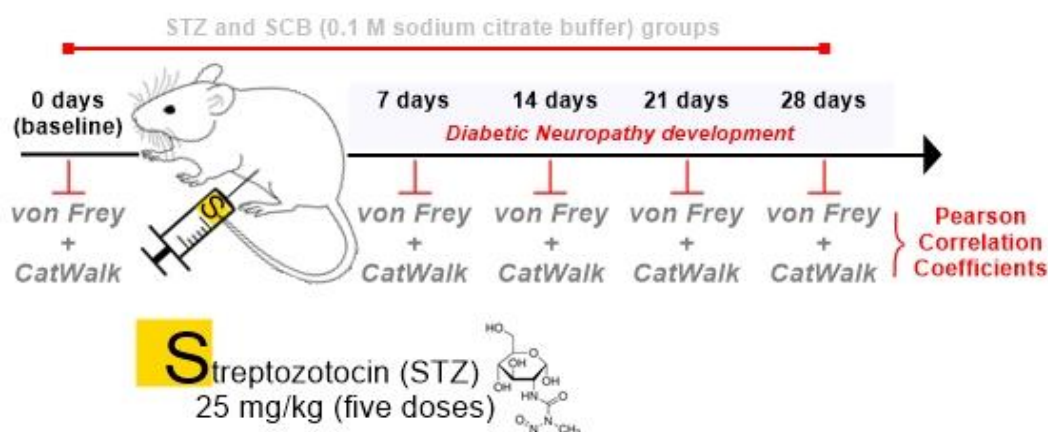


Figure 1. Cartoon presenting the experimental design. Rats were submitted to CatWalk and von Frey tests at the periods of 0 (baseline), 7, 14, 21, and 28 days post multiple-streptozotocin doses (STZ, 25 mg/kg/day) or 0.1 M sodium citrate buffer (SCB, vehicle) through intraperitoneal injections, once a day and during 5 consecutive days. At the period 0 (zero), rats received the first STZ or vehicle injection immediately after the baseline von

Frey and CatWalk assessments. Seven days after starting STZ or vehicle injections (48 hours after the last STZ/SCB injection), rats that reached the minimum expected level of 250 mg/dL blood glucose were considered diabetic. Data of hyperglycemia, body weight, mechanical withdrawal thresholds and gait parameters were collected and statistically compared between STZ and SCB groups. Furthermore, data collected from von Frey and CatWalk gait analysis at each time point were correlated by Pearson's Correlation Coefficients to observe possible relationships between hyperalgesia development and motor function dynamics.

Mechanical withdrawal thresholds: von Frey test

Mechanical withdrawal thresholds were determined by applying the von Frey test, using a digital analgesimeter (Vivancos et al., 2004). A polypropylene pipette tip adapted to a hand-held force transducer was applied to the plantar surface of the right and left hind paws of the rats with crescent pressure until obtain a paw withdrawal reflex. The equipment transduces automatically the pressure applied to the paw mid-plantar surface into gram-force (g) at the moment of paw withdrawn. Rats were randomly placed into individual plastic cages with a metal mesh floor, followed by 30 minutes of acclimatization prior the test. Diabetic (STZ, 412.62 ± 50.16 mg/dL of blood glucose) and control rats (SCB, 0.1 M sodium citrate buffer, 111.28 ± 10.65 mg/dL of blood glucose) were submitted to electronic von Frey test at 0, 7, 14, 21, and 28 days after STZ or vehicle injections, always in the mid-morning period, by a blind-examiner. No analgesic medicine has been given to rats during the entire study.

CatWalk gait analysis

CatWalk walking track test (Noldus Inc., Wageningen, Netherlands) consists in an illuminated-walkway glass-floor with a high-speed video camera (Gevicam GP-3360; GEViCAM Inc., Milpitas, CA, USA) equipped with a wide-angle lens (6.0 mm; DF6HA-1B, Fujinon Corp., China). The camera was positioned underneath the walkway at a distance of 56 cm and the paws prints were automatically recorded by the CatWalkTM XT 10.6 software as the animal crossed the pathway in a calibrated 20 x 10 cm length lane. The green LED plus a red-illuminated background creates a contrast in the glass-floor according to animal steps. CatWalk XT configurations are described in Table 1.

Table 1. CatWalk XT configurations.

Green Intensity threshold	Max. allowed speed duration	Crossing time
0.25 (a. u.)	60 %	0.5 – 8.0 s
Red ceiling light	Green walkway light	Camera gain
17.8 (a. u.)	16.5 (a. u.)	25.01(a. u.)

a. u. = arbitrary units; % = percent; s = seconds.

Gait analysis was performed at 0, 7, 14, 21, and 28 days after starting STZ or vehicle injections, always in the afternoon with the room lights switched-off. During each period of analysis each rat performed three runs [STZ = 24 runs (8 rats x 3 runs); SCB = 21 runs (7 rats x 3 runs), every week] totaling 120 runs for STZ group (24 runs x 5 weeks) and 105 runs for SCB group (21 runs x 5 weeks). The chosen CatWalk parameters are described according to the manual of the equipment producer, as follows:

- *Maximum and mean intensities (a. u.):* it is the maximum or the mean intensity of the complete paw;
- *Mean intensity of the 15 most intense pixels (a. u.):* this is the mean intensity of the 15 pixels of a paw with the highest intensity;
- *Stand (s) (or stance):* it is the duration in seconds of contact of a paw with the glass-floor;
- *Swing (s):* it is the duration in seconds of no contact of a paw with the glass-floor;
- *Maximum contact area (cm²):* it is the maximum area of a paw that comes into contact with the glass-floor;
- *Print area (cm²):* it is the surface area of the complete print. Print Area is by definition at least as large as the Maximum Contact Area;
- *Stride length (cm):* it is the distance between successive placements of the same paw;
- *Print width (cm):* it is the width (vertical direction) of the complete paw print;
- *Step cycle (s):* it is the time in seconds between two consecutive initial contacts of the same paw: Step Cycle = Stand + Swing;
- *Duty cycle (%):* it expresses Stand as a percentage of Step Cycle: Duty Cycle = $Stand / (Stand + Swing) \times 100\%$;
- *Single stance (s):* Single Stance is the duration (in seconds) of ground contact for a single hind paw (Coulthard et al., 2002; 2003). It is used for gait analysis in pain models. In CatWalk XT, Single Stance is the part in the Step Cycle of a hind paw where the contralateral hind paw does not touch the glass-floor;

- *Initial dual stance (s)*: Dual Stance is the duration (in seconds) of ground contact for both hind paws simultaneously (Coulthard et al., 2002; 2003). Dual Stance is also used for gait analysis in pain models. Initial Dual Stance is the first time in a Step Cycle of a hind paw that the contralateral hind paw also makes contact with the glass-floor;
- *Body speed (cm/s)*: the Body Speed of a Step Cycle of a specific paw is calculated by dividing the distance that the animal's body moved from one initial contact of that paw to the next by the time to travel such distance;
- *Body speed variation (%)*: it is calculated by dividing the absolute difference between the Body Speed and the Average Speed of a run by the Average Speed.

Other basic parameters such as Run Duration (s), Run Average Speed (cm/s), Run Maximum Variation (%), Number of Steps, and Cadence (steps/second), were examined as General parameters. All the described parameters were captured from the front and hind paws (RF – right front; LF – left front; RH – right hind; LH – left hind, respectively). We emphasized the average of the hind paws because of subsequent correlations with mechanical withdrawal thresholds (von Frey test), once that analysis of mechanical hyperalgesia refers to the hind limbs (RH and LH).

Statistical analysis

For comparisons between groups and time, we used Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Other comparisons between three or more groups were made by One-way ANOVA, also followed by Bonferroni post-hoc test. For comparisons between only two groups, we use unpaired *t-test*. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***) were considered statistically significant. To analyze correlations between von Frey withdrawal thresholds and CatWalk gait parameters, Pearson's Correlation Coefficients were calculated. Regression lines were also calculated and plotted with aid of the GraphPad Prism® Version 5 software. Numerical values were expressed as mean $\pm$ SEM.

Results

Streptozotocin (STZ)-induced hyperglycemia in rats

As shown in Fig. 2, after multiple-STZ injections (five low-doses, 25 mg/kg/day), rats showed an important increase of glycemia (panel A) and failure in weight gain (panel B), which are the main clinical signals of type-I diabetes mellitus. It is important to observe that there is no significant difference in the diabetic rat's weight between the analyzed periods [0 (251 ± 6.75); 7 (255.75 ± 22.56); 14 (246.87 ± 20.65); 21 (245.75 ± 23); and 28 (250.25 ± 22)

days], within the STZ group (One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test). In addition, we observed other typical signals of type-I diabetes, such as polyuria and polydipsia (data not shown). However, all rats remained alive until the end of the experiments. No typical diabetic signals were observed in the sodium citrate buffer control group (SCB).

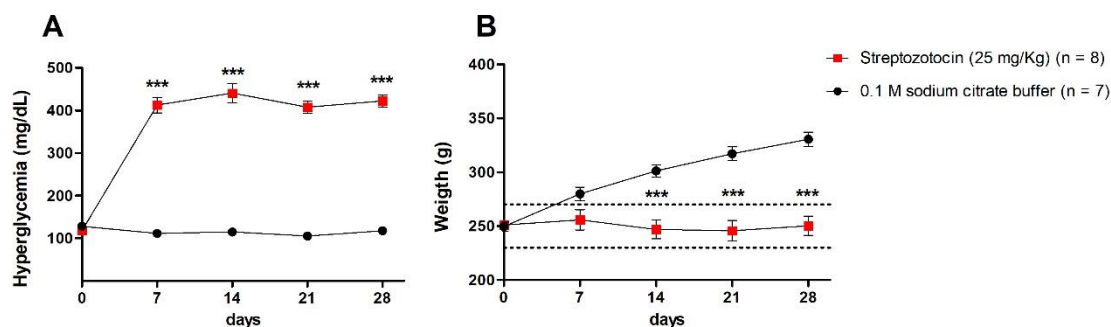


Figure 2. Hyperglycemia (mg/dL) development and rats' bodyweight (g). (A) Seven days after starting the multiple-STZ injections (25 mg/kg once a day for 5 consecutive days) a significant increase in hyperglycemia (mg/dL) was observed when compared with sodium citrate buffer control group (SBC). (B) Rats treated with STZ failure to gain weight (g) when compared to SBC group; there is no difference between the analyzed periods (0, 7, 14, 21, and 28 days) within the STZ group itself (One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test). The symbol (***) means significant difference between the groups ($p < 0.001$; Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test; $n = 8-7$ rats per group). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Mechanical withdrawal thresholds: von Frey test

As shown in Fig. 3, rats treated with STZ, but not with vehicle, showed increases in the intensity of hyperalgesia (Δ withdrawal threshold, g) after the 14th day post treatment, persisting until the end of the experimental protocol (28th day) (Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test). We also observed differences within the STZ group, when comparing the time-analyzed periods: 7 (2.23 ± 2.18) vs 21 (10.35 ± 2.80); 7 (2.23 ± 2.18) vs 28 (12.15 ± 2.46); 14 (5.66 ± 2.24) vs 28 (12.15 ± 2.46) (One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test).

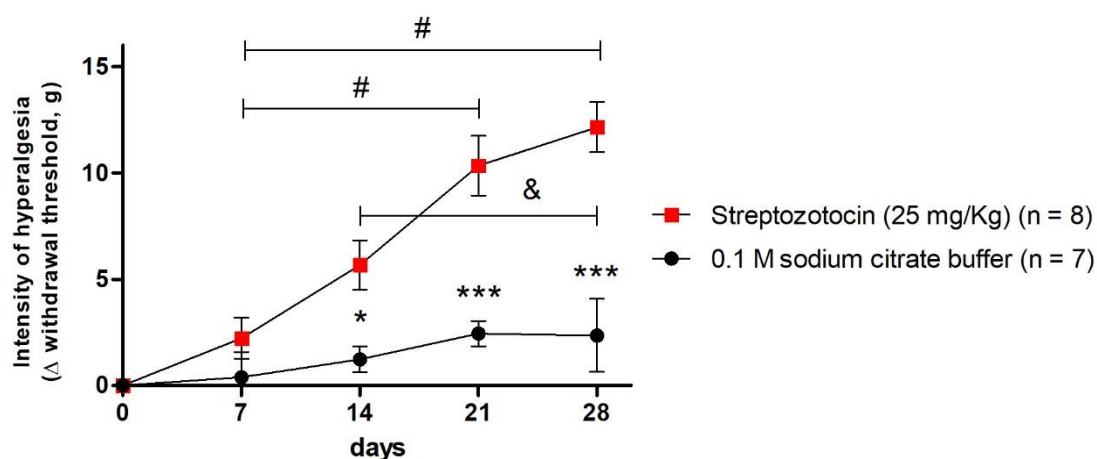


Figure 3. STZ treatment induced mechanical hyperalgesia verified by von Frey test. 14 days after starting the multiple-STZ injections (25 mg/kg once a day for 5 consecutive days) a significant increase in hyperalgesia (Δ withdrawal threshold, g) was observed in the STZ group when compared with sodium citrate buffer control group (SCB). The hyperalgesia was also affected by the time during the analyzed 28 days (Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test). Within the STZ group, significant differences were observed between the time-analyzed periods, as pointed at by the symbols [(#) = $p < 0.001$ and (&) = $p < 0.05$] (One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test). Data refer to averaged mechanical withdrawal thresholds from the right (RH) and left (LH) hind paws. The symbols (*) and (***) mean significant difference between the groups STZ and SCB ($p < 0.05$ and $p < 0.001$ respectively; Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test; $n = 8-7$ rats per group). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Run general parameters

Before analyzing the specific paw parameters, we verified possible differences between general gait characteristics from the two groups (SCB and STZ). All the analyzed general gait parameters [Run duration (s); Run average speed (cm/s); Run maximum variation (%); Number of steps; Cadence (steps/second)] showed no differences between the groups, i.e., the STZ-induced hyperalgesia was not able to alter such gait characteristics, as shown in Fig. 4.

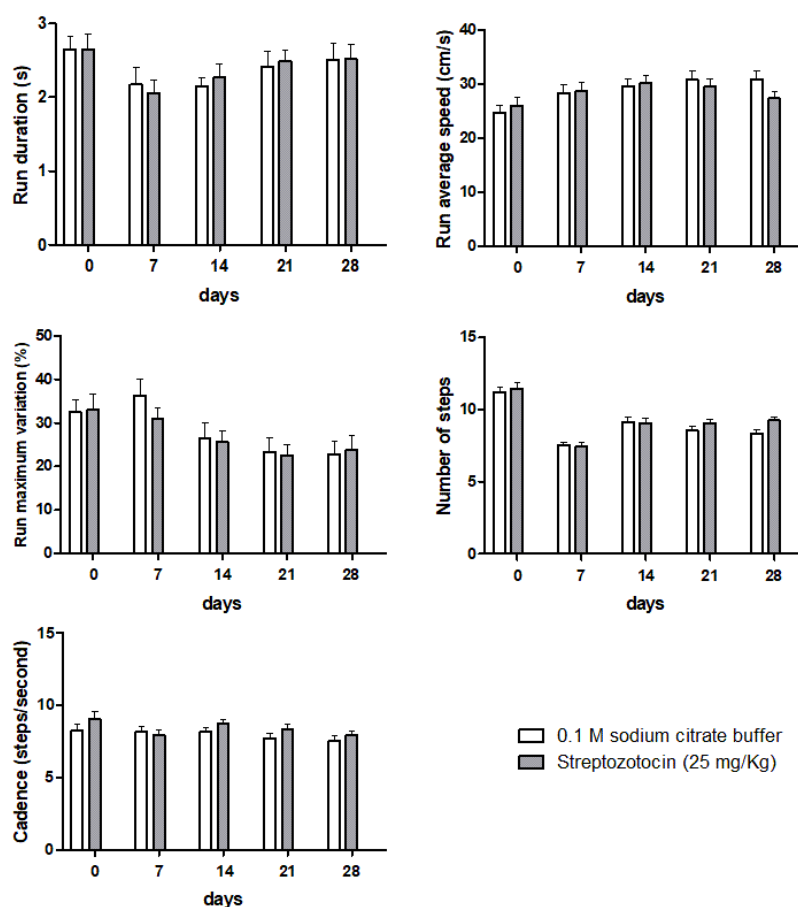


Figure 4. General gait parameters from SCB and STZ groups. There were no significant differences in the general gait parameters between the SCB (control) and STZ (hyperalgesic) groups. All parameters related to Run duration, Average speed, Maximum variation, Number of steps, and Cadence stayed in balance from the basal analysis until the 28th day of experiment. Statistical analyses were performed by Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Intensity parameters

As illustrated in Fig. 5 and Fig. 6, rats treated with STZ (hyperalgesic) printed their paw during the run on the glass-floor with less intensity, when compared with the SCB treated group (non-hyperalgesic). The treatment with STZ induced an important reduction in the contact intensity of the paw over the glass-floor at 14 days post multiple-STZ injections (Figures 5B, D and 6B, C, D). As shown in Fig. 7, the less-applied pressure by the hind paws at this period promoted decreases in the Maximum (a. u.) ($p < 0.01$) and Mean Intensities (a. u.) ($p < 0.05$). Furthermore, there was a reduction in the Mean Intensity of the 15 most Intense Pixels (a. u.) when comparing to control (SCB) ($p < 0.001$) (Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test).

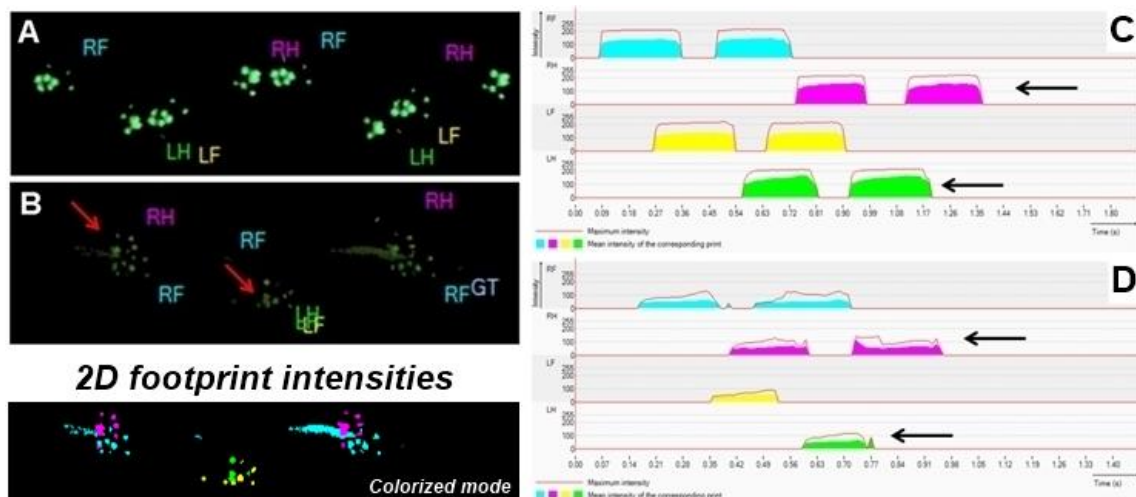


Figure 5. General walking pattern: 2D view under the glass-floor and 2D schematic view of the Intensity. (A) Gait pattern of rats from SCB group showing a normal paw imprint at 14 days post 0.1 M sodium citrate buffer injections; area of the pad and fingers appears strongly delineated for both front (RF; LF) and hind (RH; LH) paws. (B) Rats from STZ group at 14 days after multiple-STZ (25 mg/kg) injections showed reduced intensity of the paw contact, as pointed by the red arrows. Low definition area of the paw imprints represents the altered walking pattern, which involves the front (RF; LF) and hind (RH; LH) paws, as showed in the colorized mode. (C) 2D walking pattern of rats from SCB group at 14 days post 0.1 M sodium citrate buffer injections. Black arrows are pointing at RH (right hind limb) and LH (left hind limb) in a normal condition of paw contact and intensity. (D) 2D walking pattern of rats from STZ group at 14 days post multiple-STZ injections (25 mg/kg/day). Black arrows indicate a reduced maximum (thin red line) and mean intensities (pink and green fill colors) for both corresponding prints of hind limbs (RH and LH). RF (right front limb) and LF (left front limb) also showed a reduction in the maximum and mean intensities (sea blue and yellow fill colors, respectively). GT = genitalia.

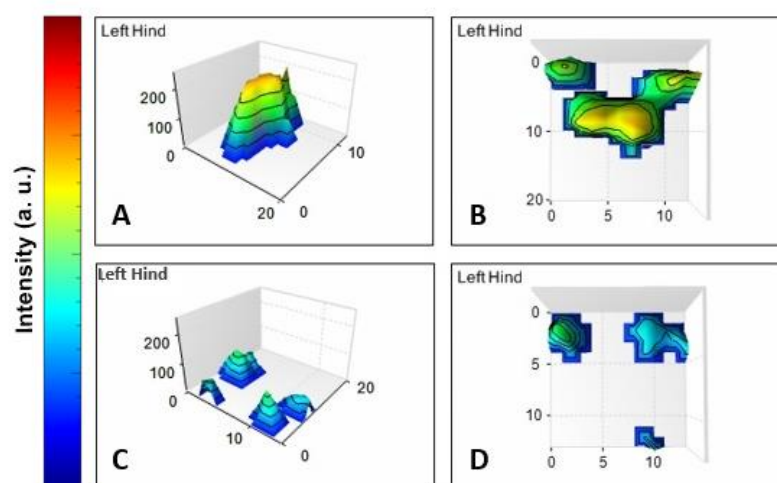


Figure 6. 3D plotting of footprint intensities. Panel (A) depicts the normal contact and intensity of the paw imprint performed by the sodium citrate buffer-injected rats (SCB, control), as represented by the ascending colors (blue to red). Panels (C) and (D) represent the 3D view of a single paw (left hind) from 14 days STZ (25 mg/kg/day)-injected rat. There is a reduction in the intensity and altered positioning of the paw. a. u. = arbitrary units.

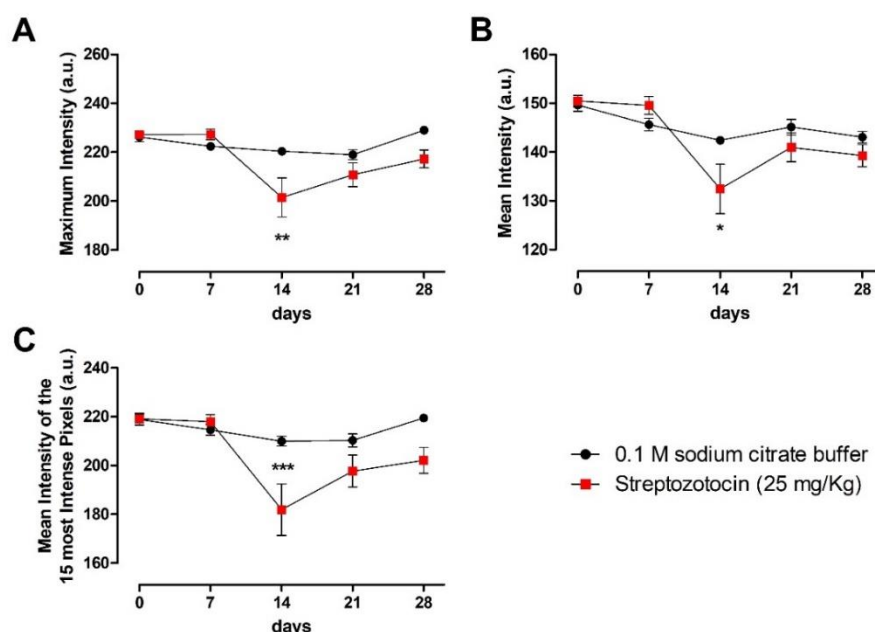


Figure 7. CatWalk Intensity parameters related to rats hind paws. There were significant differences between the SCB and STZ groups especially at 14 days after STZ or vehicle injections. There was significant reduction in the Maximum Intensity (a. u.) ($p < 0.01$) (A), Mean Intensity (a. u.) ($p < 0.05$) (B), and in the Mean Intensity of the 15 most Intense Pixels (a. u.) ($p < 0.001$) (C) in the STZ group comparing to control. The differences in the CatWalk Intensity parameters disappeared at 21 and 28 days of the experimental protocol. Symbols (*), (**), and (***) mean significant differences between the groups STZ (hyperalgesic) and SCB

(control) ($p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$, respectively) (Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test). a. u. = arbitrary units. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

We also observed a similar behavior regarding the intensities of the front paws (RF and LF). There were significant differences between SCB and STZ groups for Maximum Intensity (a. u.) at 14 days post STZ or vehicle injections ($p < 0.01$). The Mean Intensity (a. u.) of the front paws (RF and LF) was lower in the STZ group compared to control at 14, 21, and 28 days ($p < 0.05$). The Mean Intensity of the 15 most Intense Pixels (a. u.) was significantly lower at 14 ($p < 0.001$) and 21 ($p < 0.05$) days in the STZ group (Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test) (data not shown).

Spatiotemporal parameters

The two main spatiotemporal gait parameters, Stand (s) and Swing (s), showed no alterations for both groups (STZ and SCB) during the periods of analysis (Fig. 8). The timing diagrams showed normal contact for the given paws during the gait, as demonstrated in Fig. 9. We also analyzed Stand and Swing parameters from the front paws (RF and LF) and, likewise for the hind paws (RH and LH), there were no differences between the groups (data not shown).

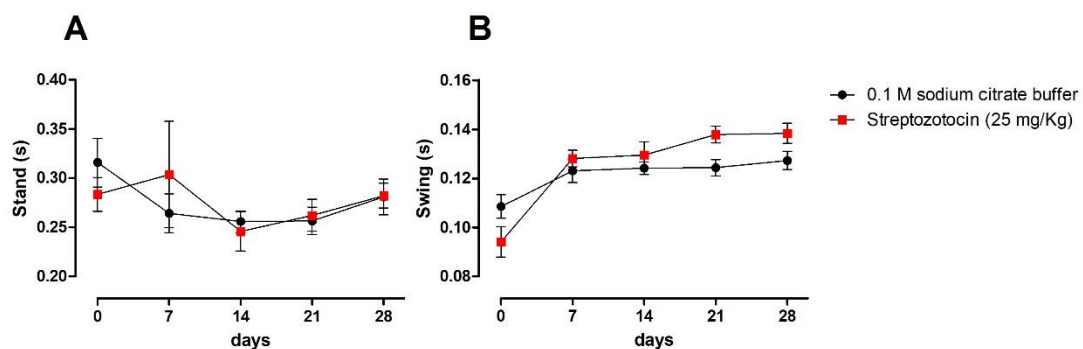


Figure 8. Stand (s) and Swing (s). (A) Stand: averaged time in which the rat remains with paws in contact with the glass floor. There are no significant differences between the STZ (hyperalgesic) and SCB (control) groups regarding to RH and LH paws (right and left hind limbs, respectively). The same behavior was observed for the Swing (B), which represents the averaged time in which the animal performed the elevation of the limb, i.e., time between two consecutive paw contacts. No differences have been seen for the RF and LF paws (data not shown) (Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

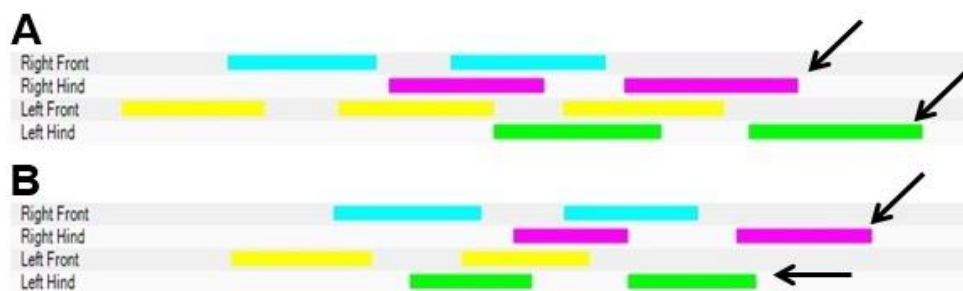


Figure 9. CatWalk Timing diagrams illustrating the contact of the paws with the glass-floor. (A) Representative illustration of rats paw prints registered during walking at 28 days post multiple-STZ (5 x 25 mg/kg) injections and (B) post 0.1 M sodium citrate buffer injections (SCB), control. The length of each bar represents the durations of the Stand (Stance phase) for a particular paw. The spaces between bars are indicating the Swing (moment in which the paw is out of contact with the glass floor). Black arrows are pointing at the right (pink bar) and left (green) hinds from both groups (STZ and SCB, A and B, respectively). No spatiotemporal alterations were observed regarding to RF and LF paws (right front and left front paws).

Spatial parameters

At 28 days post injections of STZ or vehicle, hyperalgesic rats (STZ), but not controls (SCB), showed a significant reduction in some CatWalk spatial gait parameters, such as Maximum Contact Area (cm²) ($p < 0.01$), Stride Length (cm) ($p < 0.01$), Print Width (cm) ($p < 0.01$), and Print Area (cm²) ($p < 0.01$), as shown in Fig. 10. For those parameters related to front paws (RF and LF), we observed the same differences, but with less magnitude (data not shown) (Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test).

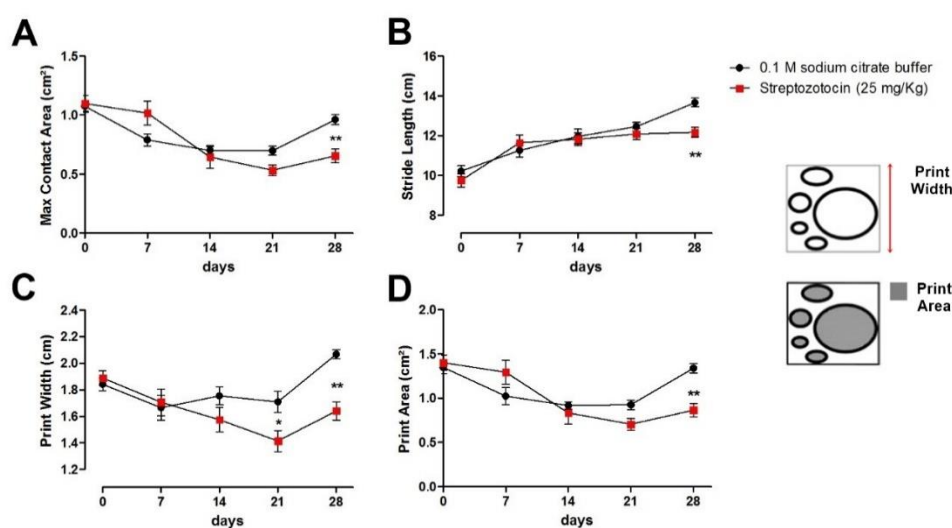


Figure 10. Spatial gait parameters. (A) Maximum Contact Area (cm²); (B) Stride Length (cm); (C) Print Width (cm); (D) Print Area (cm²). All parameters refer to the average between the right and left hind paws (RH and LH), and showed differences ($p < 0.01$) between the STZ and SCB groups at 28 days after starting the

injections. For the Print Width (cm), there were also significant differences at 21 days ($p < 0.05$). Statistical analyses were performed by Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Other gait parameters analyzed by the CatWalk system were not able to determine differences between STZ and SCB groups. They correspond to Step Cycle (s), Duty Cycle (%), Initial Dual Stance (s), Single Stance (s), Body Speed (cm/s), and Body Speed Variation (%), as shown in Table 2.

Table 2. Other parameters. Data refer to the average between RH and LH paws.

Parameters	SCB (0.1 M sodium citrate buffer)	STZ (25 mg/kg)
Step Cycle (s)	0.39 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.02
Duty Cycle (%)	67.31 $\pm$ 2.12	66.28 $\pm$ 3.33
Single Stance (s)	0.12 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.02
Initial Dual Stance (s)	0.08 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01
Body Speed (cm/s)	27.27 $\pm$ 2.36	27.15 $\pm$ 1.23
Body Speed Variation (%)	16.63 $\pm$ 3.67	15.88 $\pm$ 3.18

M = molar; mg/kg = milligrams per kilo; s = seconds; % = percent; cm/s = centimeters per second. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Thus, we have chosen the parameters that showed significant differences in the last period of analysis [Maximum Contact Area (cm²); Stride Length (cm); Print Area (cm²)] and correlated these functional data with the development of mechanical hyperalgesia. This correlation analysis has been done to observe if an increased sensitivity to mechanical stimuli could cause the animal to exert less pressure on the hind limbs during the gait. According to the Pearson's Correlation Coefficient, the Maximum Contact Area (cm²), Print Area (cm²), and Stride Length (cm) of the hind paws presented strong correlation with the progressive decline of mechanical withdrawal thresholds and increase of hyperalgesia (von Frey test), i.e., these parameters obtained from CatWalk are altered in parallel with the experienced pain. The Pearson's correlations and the regression lines are plotted in the graphs as shown in Fig. 11.

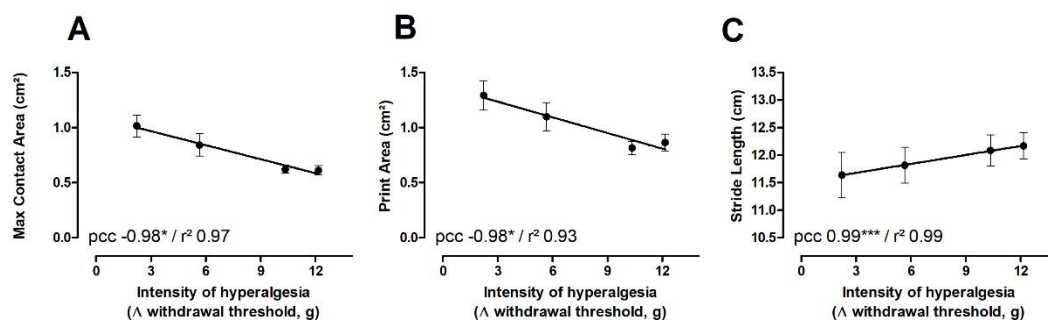


Figure 11. Pearson's Correlation Coefficients: CatWalk gait parameters *versus* mechanical withdrawal thresholds. As both the Maximum Contact Area (cm²) and Print Area (cm²) decreases (panels A and B, respectively), the averaged mechanical hyperalgesia (Δ withdrawal threshold, g) increases with time (7, 14, 21, and 28 days after multiple-STZ injections) (pcc -0.98, *p < 0.05, r² 0.97, and pcc -0.98, *p < 0.05, r² 0.93, respectively). Thus, there was an inverse correlation between the Maximum Contact Area (cm²) plus Print Area (cm²) and the averaged mechanical hyperalgesia, i.e., the lower the areas of Maximum Contact and paw Print Area, the higher the mechanical withdrawal thresholds. (C) As the Stride Length (cm) increases, the average of mechanical hyperalgesia (Δ withdrawal threshold, g) also increases with time (7, 14, 21, and 28 days after multiple-STZ injections), as demonstrated by Pearson's Correlation Coefficients (pcc 0.99, ***p < 0.001, r² 0.99).

Discussion

To our knowledge, this is the first study that highlights the motor alterations in a rat model of STZ-induced diabetic neuropathy. We have correlated altered gait parameters with mechanical withdrawal thresholds. Then, at 28 days post multiple-STZ injections, we observed a strong positive correlation between hyperalgesia development and the increase on the distance between successive placements of the same paw (Stride Length, in cm). The surface area of the complete print (Print Area, in cm²), and the maximum area of a paw that encounters the glass-floor (Maximum Contact Area, in cm²), showed an inverse correlation with the mechanical hyperalgesia development.

It has been suggested that sensory neurons are the primary target of type-1 diabetes, before significant motor involvement (Zochodne et al., 2008). This diabetic condition is characterized by innervation loss in the skin and retraction of their distal branches and nerve endings (Kambiz et al., 2015). Both large and small caliber nerve fibers are affected (Yagihashi et al., 2011), with changes of endoneurium microvessels (Thrainsdottir et al., 2003). There is also an increased polyol flux regulated by aldose reductase (AR) (Yagihashi et al., 2011), glycation and advanced glycation end-products (AGE) (Sugimoto et al., 2008), and the generation of free radicals (Pop-Busui et al., 2006). All these hyperglycemia-induced

alterations lead to a tissue injury induced by oxidative stress in the peripheral nerve trunks in experimental diabetes (Greene et al., 1999; Toth et al., 2007; Obrosova et al., 2007).

In this study, by using the electronic von Frey test, we observed a significant increase in the mechanical hyperalgesia at 14 days after starting the multiple-STZ injections, when compared with sodium citrate buffer control group (SCB). The measured hyperalgesia was also affected by the time during the analyzed 28 days. These results are in agreement with the firstly reported by Ahlgren and Levine (1993), in which was observed a decrease in mechanical nociceptive threshold in rats' hindpaw after one week of STZ injection. Within the STZ group, significant differences were observed between the time-analyzed periods, culminating in peaks of hyperalgesia at 21 and 28 days after starting the STZ injections. These hyperalgesia occurrences were followed, especially at the 28th day, by alterations in the gait pattern.

Several previous studies have utilized gait analysis as an indicator of painful outcome in rodents models of peripheral neuropathy (Chiang et al., 2014; Truin et al., 2009; Huehnchen et al., 2003; Mogil et al., 2010; Pitzer et al., 2016). Modern equipments, such as the CatWalk system, can help us to understand better each gait characteristic through the analysis of the parameters that constitutes the walking performance.

CatWalk gait parameters, such as Mean Intensity, Stand, and Swing duration, have been associated to mechanical hyperalgesia in other models of neuropathic pain, such as nerve constriction (Vrinten; Hamers, 2003). In our study, Maximum Intensity was the main altered-parameter at 14 days after multiple-STZ injections, corroborating with other studies about peripheral diabetic neuropathy and motor function analysis (Benitez et al., 2015). We observed that diabetic rats applied less pressure during the paw contact perform at 14 days after STZ treatment. This condition has been minimized when the time goes by, maybe through a kind of compensatory response. The intensity of the paw contact onto the glass-floor returns to normal values, but there is a compensatory mechanism, i.e., the rats performed the step in a smaller contact area. This reduction in the support area occurs in parallel with the increased intensity of hyperalgesia in a strong inverse correlation pattern, especially at 28 days.

It has been described a decrease in the paw contact and paw print area in carrageenan-induced arthritic rats in the ankle joint (Möller et al., 2008), but, differently from ours, that study showed alterations in the duration of contact with the floor (Stand phase). This characteristic is also common in muscular (Vieira et al., 2016) and articular (Gabriel et al.,

2007; Ängeby Möller et al., 2012; Möller et al., 2008) dysfunctions analyzed by the CatWalk system.

We believe that the intensity of the paw contact better illustrates the type-1 diabetes-induced neuropathy rather than the spatiotemporal parameters, such as Stand and Swing gait durations, because one of the major gait debility in type-1 diabetes is associated with the development of neuropathy. Motor function alterations in animal models of musculoskeletal diseases, such as knee joint arthritis, are especially characterized by changes in spatiotemporal gait parameters. However, in type-1 diabetes these changes are supposed to be consequence of a progressive loss of innervation and refined physiological control of biomechanics. This hypothesis totally agrees with our data, because at the 28th day, but not at the 14th day post STZ treatment, the major gait alterations involve spatiotemporal parameters.

In neuropathic pain states, the gait disability may depend on the type of neuropathy. For example, it has been demonstrated that paclitaxel-induced sensory polyneuropathy leads to spatiotemporal gait parameters alterations that were not observed in STZ-induced diabetic neuropathy, such as increased Swing phase and reduced Stance phase (Huehnchen et al., 2013). However, a reduction in the hind paw Print Area (cm²) seems to be a common denominator of gait disability in neuropathic pain models. This reduction in the paw Print Area usually occurs as a result of a combination of altered parameters, such as a decrease in Stand duration and Maximum and Mean Intensities with a concomitant reduction in the Maximum Contact Area, the Length and Width of hind paws (Shepherd and Mohapatra, 2018). We did not observe changes in general parameters of the runs between the STZ-induced diabetic neuropathy group and its control. According to our data, diabetic neuropathy does not alter general gait characteristics in rats, such as duration, velocity, variation, number of steps, and cadence. Similarly, the rat model of nucleus pulposus-mediated pain does not alter the speed and the number of steps, also evaluated by the CatWalk system (Kameda et al., 2017).

Finally, our results demonstrated that the CatWalk method was able to identify the motor function alterations caused by the STZ-induced diabetic neuropathy. The altered gait pattern, in particular the Maximum Contact Area, Print Area and Stride Length, was highly correlated with the mechanical withdrawal thresholds assessed by the electronic von Frey test. However, the altered-gait parameters were identified at specific periods throughout the development of diabetic hyperalgesia. In this sense, we might state that the issues analyzed by both methods (hyperalgesia and gait alterations) are correlated, but not dependent on each other.

Conclusions

Spatial gait alterations can be detected in the rat model of STZ-induced diabetic neuropathy by using the CatWalk gait analysis system. Hitherto, the electronic von Frey test still being the gold standard for the assessment of mechanical hyperalgesia. Thus, the correlation between electronic von Frey test and automated CatWalk gait analysis introduce a novel approach to study the development of painful conditions linked to diabetes and may therefore be relevant for future studies.

Acknowledgments

This work was supported by FAPESP (Sao Paulo Research Foundation, grants numbers 2014/25153-7; 2015/12673-5; 2018/05108-8) and CAPES (Coordination of Improvement of Higher Education Personnel). MACH is a Research Fellow from CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, Process n. 305099/2011-6; 454791/2014-3; 310111/2016-4).

Authorship contribution statement

Authorship was based on ICMJE definition. W. F. Vieira and C. A. Parada designed the research study; W. F. Vieira, S. F. de Magalhães, K. F. Malange, G. G. dos Santos collected the data; A. L. R. de Oliveira provided the CatWalk gait analysis apparatus; W. F. Vieira analyzed the data; W. F. Vieira, M. A. da Cruz-Höfling, and C. A. Parada interpreted the data, wrote and corrected the manuscript.

Declarations of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Baron, R. & Tölle, T. R. Assessment and diagnosis of neuropathic pain. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care* **2**, 1–8 (2008). DOI: 10.1097/SPC.0b013e3282f57da5.
- Tomlinson, D. R. & Gardiner, N. J. 2007 Pns plenary lecture and review. Diabetic neuropathies : components of etiology. **121**, 112–121 (2008). DOI: 10.1111/j.1529-8027.2008.00167.x.
- Javed, S., Petropoulos, I. N., Alam, U. & Malik, R. A. Treatment of painful diabetic neuropathy. 15–28 (2015). DOI:10.1177/2040622314552071.
- Zochodne, D. W. Neurotrophins and Other Growth Factors in Diabetic Neuropathy. *Semin.*

- Neurol.* **16**, (1996). DOI: 10.1055/s-2008-1040971.
- Wright, D. E., Ryals, J. M., McCarson, K. E. & Christianson, J. A. Diabetes-induced expression of activating transcription factor 3 in mouse primary sensory neurons. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **9**, 242–254 (2004). DOI: 10.1111/j.1085-9489.2004.09404.x.
- Zochodne, D. W., Ramji, N. & Toth, C. Neuronal targeting in diabetes mellitus: a story of sensory neurons and motor neurons. *Neuroscientist* **14**, 311–318 (2008). DOI: 10.1177/1073858408316175.
- Gispén, W. H. & Biessels, G. J. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci.* **23**, 542–549 (2000). DOI: 10.1016/S0166-2236(00)01656-8.
- Northam, E. A. *et al.* Central Nervous System Function in Youth With Type 1 Diabetes 12 Years After Disease Onset. *Diabetes Care* **32**, 445–450 (2009). DOI: 10.2337/dc08-1657.
- Yagihashi, S., Mizukami, H. & Sugimoto, K. Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go? *J. Diabetes Investig.* **2**, 18–32 (2011). DOI: 10.1111/j.2040-1124.2010.00070.x.
- Schwartz, A. V. *et al.* Diabetes-Related Complications, Glycemic Control, and Falls in Older Adults. *Diabetes Care* **31**, 391–396 (2008). DOI: 10.2337/dc07-1152.
- Benítez, S. U., Carneiro, E. M. & de Oliveira, A. L. R. Synaptic input changes to spinal cord motor neurons correlate with motor control impairments in a type 1 diabetes mellitus model. *Brain Behav.* **5**, 1–9 (2015). DOI: 10.1002/brb3.372.
- Hamers, F. P., Lankhorst, a J., van Laar, T. J., Veldhuis, W. B. & Gispén, W. H. Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries. *J. Neurotrauma* **18**, 187–201 (2001). DOI: 10.1089/08977150150502613.
- Coulthard, P., Simjee, S. U. & Pleuvry, B. J. Gait analysis as a correlate of pain induced by carrageenan intraplantar injection. *J. Neurosci. Methods* **128**, 95–102 (2003). DOI: 10.1016/S0165-0270(03)00154-7.
- Vrinten, D. H. & Hamers, F. F. T. ‘CatWalk’ automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. *Pain* **102**, 203–209 (2003). DOI: 10.1016/s0304-3959(02)00382-2.
- Gabriel, a F., Marcus, M. a E., Honig, W. M. M., Walenkamp, G. H. I. M. & Joosten, E. a J. The CatWalk method: A detailed analysis of behavioral changes after acute inflammatory pain in the rat. *J. Neurosci. Methods* **163**, 9–16 (2007). DOI: 10.1016/j.jneumeth.2007.02.003.

- Ferreira-Gomes, J., Adães, S. & Castro-Lopes, J. M. Assessment of Movement-Evoked Pain in Osteoarthritis by the Knee-Bend and CatWalk Tests: A Clinically Relevant Study. *J. Pain* **9**, 945–954 (2008). DOI: 10.1016/j.jpain.2008.05.012.
- Chiang, C.-Y. *et al.* Comprehensive analysis of neurobehavior associated with histomorphological alterations in a chronic constrictive nerve injury model through use of the CatWalk XT system Laboratory investigation. *J Neurosurg* **120**, 250–262 (2014). DOI: 10.3171/2013.9.JNS13353.
- Ängeby Möller, K., Kinert, S., Størkson, R. & Berge, O. G. Gait Analysis in Rats with Single Joint Inflammation: Influence of Experimental Factors. *PLoS One* **7**, (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0046129.
- Vieira, W. F., Kenzo-Kagawa, B., Cogo, J. C., Baranauskas, V. & Da Cruz-Höfling, M. A. Low-level laser therapy (904 nm) counteracts motor deficit of mice hind limb following skeletal muscle injury caused by snakebite-mimicking intramuscular venom injection. *PLoS One* **11**, (2016). DOI: 10.1371/journal.pone.0158980.
- Guy, R., Grynspan, F., Ben-Zur, T., Panski, A., Lamdan, R., Danon, U., Yaffe, D., Offen, D. Human muscle progenitor cells overexpressing neurotrophic factors improve neuronal regeneration in a sciatic nerve injury mouse model. *Front. Neurosci.* **13**, 151 (2019). DOI: 10.3389/fnins.2019.00151.
- Ren, K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. *Physiol. Behav.* **67**, 711–716 (1999). DOI: 10.1016/S0031-9384(99)00136-5.
- Furman, B. L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **70**, 5.47.1-5.47.20 (2015). DOI: 10.1002/0471141755.ph0547s70.
- Vivancos, G. G. *et al.* An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **37**, 391-399 (2004). DOI: 10.1590/S0100-879X2004000300017.
- Coulthard, P., Pleu, B. J., Brewster, M., Wilson, L. & Macfarlane, T. V. Gait analysis as an objective measure in a chronic pain model. *J. Neurosci. Methods* **116**, 197–213 (2002). DOI: 10.1016/S0165-0270(02)00042-0.
- Kambiz, S. *et al.* An early diagnostic tool for diabetic peripheral neuropathy in rats. *PLoS One* **10**, 1–15 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0126892.
- Thrainsdottir, S. *et al.* Endoneurial capillary abnormalities presage deterioration of glucose tolerance and accompany peripheral neuropathy in man. *Diabetes* **52**, 2615–2622 (2003). DOI: 10.2337/diabetes.52.10.2615.
- Sugimoto, K., Yasujima, M. & Yagihashi, S. Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Neuropathy. 953–961 (2008). DOI: 10.2174/138161208784139774.

- Pop-busui, R., Sima, A. & Stevens, M. Diabetic neuropathy and oxidative stress. 257–273 (2006). DOI: 10.1002/dmrr.625.
- Greene, D. A., Stevens, M. J., Obrosova, I. & Feldman, E. L. Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. (1999). DOI: 10.1016/S0014-2999(99)00356-8.
- Toth, C., Martinez, J. & Zochodne, D. W. RAGE, diabetes, and the nervous system. 766–776 (2007). DOI: 10.2174/156652407783220705.
- Obrosova, I. G. *et al.* High-fat diet induced neuropathy of pre-diabetes and obesity: effects of "healthy" diet and aldose reductase inhibition. **56**, (2007). DOI: 10.2337/db06-1176.
- Ahlgren, S. C., Levine, J. D. Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats. *Neuroscience* **52**, 1049-1055 (1993). DOI: 10.1016/0306-4522(93)90551-P.
- Truin, M. *et al.* The effect of Spinal Cord Stimulation in mice with chronic neuropathic pain after partial ligation of the sciatic nerve. *Pain* **145**, 312–318 (2009). DOI: 10.1016/j.pain.2009.06.034.
- Huehnchen, P., Boehmerle, W. & Endres, M. Assessment of Paclitaxel Induced Sensory Polyneuropathy with ‘Catwalk’ Automated Gait Analysis in Mice. *PLoS One* **8**, (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0076772.
- Mogil, J. S. *et al.* Hypolocomotion, asymmetrically directed behaviors (licking, lifting, flinching, and shaking) and dynamic weight bearing (gait) changes are not measures of neuropathic pain in mice. *Mol. Pain* **6**, 34 (2010). DOI: 10.1186/1744-8069-6-34.
- Pitzer, C., Kuner, R. & Tappe-Theodor, A. Voluntary and evoked behavioral correlates in neuropathic pain states under different social housing conditions. *Mol. Pain* **12**, 1–15 (2016). DOI: 10.1177/1744806916656635.
- Möller, K. a., Berge, O. G. & Hamers, F. P. T. Using the CatWalk method to assess weight-bearing and pain behaviour in walking rats with ankle joint monoarthritis induced by carrageenan: Effects of morphine and rofecoxib. *J. Neurosci. Methods* **174**, 1–9 (2008). DOI: 10.1016/j.jneumeth.2008.06.017.
- Kameda, T., Kaneuchi, Y., Sekiguchi, M. & Konno, S. Measurement of mechanical withdrawal thresholds and gait analysis using the CatWalk method in a nucleus pulposus- applied rodent model. 1–11 (2017). DOI: 10.1186/s40634-017-0105-5.
- Shepherd, A. J. & Mohapatra, D. P. Pharmacological validation of voluntary gait and mechanical sensitivity assays associated with inflammatory and neuropathic pain in mice. *Neuropharmacology* **130**, 18–29 (2018). DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.11.036.

Apêndice 8

Anti-hyperalgesic effects of photobiomodulation therapy (904 nm) on streptozotocin (STZ)-induced diabetic neuropathy: possible role of MAPK pathway.

Willians Fernando Vieira¹; Kauê Franco Malange¹; Silvine Fernandes de Magalhães¹; Júlia Borges Paes Lemes¹; Gilson Gonçalves dos Santos^{1,2}; Catarine Massucato Nishijima¹; Carlos Amilcar Parada^{1*}.

¹Laboratory for Pain Studies, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Sao Paulo, Brazil.

²Department of Anesthesiology, University of California (USCD), San Diego, La Jolla, United States of America.

*Corresponding author. Full postal address: Laboratory for Pain Studies, Carl von Linnaeus n/n, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas – Brazil, ZIP Code 13083-864. E-mail: caparada@unicamp.br

Abstract

Due the pro-inflammatory condition, diabetic neuropathy (DN) can be related to the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK), like p38. MAPK pathway is activated in response to extracellular stimulus, including interleukins, e.g. TNF- α and IL-1 β . Efficacy of photobiomodulation therapy (PBMT) in painful clinical conditions has been established by several recent studies. The aim of this study was verify the pain relief potential of PBMT in streptozotocin (STZ)-induced diabetic neuropathic rats and its influence on the MAPK pathway regulation. Experiments were approved by the UNICAMP Ethics Committee (CEUA #3902-1). Male Lewis rats (200-250 g; 6-8-weeks-old) received 5 x STZ-low doses (25 mg/kg). Diabetic animals (≥ 250 mg/dL blood glucose) were submitted to electronic von Frey test at 0, 7, 14, 21, 24 and 28 days after STZ injections. After being considered neuropathic, rats were submitted to daily PBMT (between the 21st and 28th days) (GaAs 904 nm; 2.03 Joule; 70 mW; 29 seconds), transcutaneously, at the dorsal region between L4/L5 DRG (right and left). At the 28th day DRG were collected and used to ELISA, real-time RT-qPCR, and immunofluorescence assays. Results: PBMT was able to reduce the intensity of hyperalgesia at the 24th and 28th days, decreased TNF- α and IL-1 β levels, and p38-MAPK mRNA expression in the diabetic neuropathic rats. DN induced the activation of phosphorylated p38 (p-38) MAPK and this activation was partially prevented by PBMT. Conclusions: DN promoted an increase of p38-MAPK expression related to the presence of pro-inflammatory interleukins and the PBMT (904 nm) treatment counteracted this condition.

Keywords: diabetic neuropathy; photobiomodulation; MAPK; hyperalgesia.

Short title: Photobiomodulation therapy effects on diabetic neuropathy.

1. Introduction

Diabetes can damage the peripheral nervous system (PNS) in a variety of ways, and the diabetic neuropathy (DN) is one of the most common complication of untreated diabetes. DN is characterized as a chronic complex disorder, which affects the peripheral nerves, causing a painful condition on superior and inferior limbs [1]–[4] in about 70 % of diabetic patients [5], [6]. The mechanisms by which hyperglycemia leads to peripheral nerve injury are not very clear, but it is known that several metabolic are affected [7]. The main events involve the polyol pathway, through the aldose reductase (AR) activation [8]–[11], the protein glycosylation, and the advanced glycation end-products (AGEs) production [10], [12], [13]. In addition, the free radicals formation linked to oxidative stress [14], [15], the reduced neurotrophic support [16], [17], and the increased protein kinase C activation (PKC) [9], [18] contribute to the peripheral damage. As a result of the metabolic imbalance, it culminates in mitochondrial failure [10], [19], [20] and inflammatory processes, related to phosphorylation of mitogen activated protein kinases (MAPKs) [21]–[25].

MAPK is a family of serine/threonine protein kinases responsible for transducing extracellular stimuli into intracellular posttranslational and transcriptional responses [26]–[28]. It is composed mainly by the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK1/2), p38-MAPK, and c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (SAPK/JNK) [29]. Together, the three main sub-families of MAPK (p38, ERK1/2, and JNK) coordinate several functions, such as gene transcription, protein synthesis, cell cycle, proliferation, differentiation, and apoptosis [30]–[33]. The MAPK pathway can be activated by extracellular stimuli, such as pro-inflammatory cytokines [34]–[36] and oxidative stress [30], [37]. The hyperglycemia seems to be one of the factors which could stimulate the MAPKs phosphorylation [38], once the activation of p38 have been seen in sensory neurons of diabetic rats [39] and also specifically at the DRG [40]–[43]. On the same way, the phosphorylation of JNK leads to cell apoptosis of hyperglycemia-stressed neurons via activation of caspase-3 [22], [44]–[46]. Furthermore, in chronic pain, MAPK activity stimulates the TRPV1 expression, which implicates in several diabetes complications, including thermal hyperalgesia [47]–[49].

Due the complexity of the metabolic alterations observed in DN, there are several pharmacological targets for the treatment of the painful condition, but with low efficacy. Most of the patients refers some relief of the symptoms, but it regresses over time, even before treatment ends. Characterized as an athermal process, the photobiomodulation therapy

(PBMT) consists in the activation, especially by red and infrared light, of specific cellular chromophores, such as the cytochrome c oxidase (CCO) [50]. This process is due photophysical and photochemical reactions inside the cells, when the light crosses the plasmatic membrane [51]–[53], causing the modulation of specific pathways related to cellular survival, the increase in adenosine triphosphate (ATP) and oxygen production, and nitric oxide release, for example [54]. The resultant “photobiomodulative process” can be used as a therapeutic for the treatment of inflammatory and painful conditions [55]–[61], as observed in a previous study conducted by our group [62]. Based on that, the aim of this study was to analyze the anti-hyperalgesic effects of photobiomodulation therapy (904 nm) on streptozotocin (STZ)-induced diabetic neuropathy, considering the possible role of MAPK pathway.

2. Materials and Methods

2.1 Ethics statement and animals

All experiments were approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Use (CEUA/UNICAMP, permit number 5337-1/2019) and followed the ARRIVE guidelines. The experiments also were performed in accordance to the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) and the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) guidelines. Male Lewis rats (LEW/HsdUnib, Harlan, USA, 1996), 4-8-weeks-old, weighing 200-250 g, provided by the University’s Multidisciplinary Center for Biological Research (CEMIB) were used. Rats were maintained in plastic cages with sawdust bedding (changed three times a week), in number of four per cage, and received food (commercial chow for rodents) and filtered water *ad libitum*, in a temperature- and humidity-controlled room, under 12/12 h dark/light cycle.

Rats were randomly divided into five groups, consisting of eight rats ($n = 8$) per group: Naïve (intact rats; received no injection and no PBMT); SCB (received five doses of vehicle 0.1 M sodium citrate buffer and no PBMT); STZ (received five doses of STZ, 25 mg/kg per dose, and no PBMT); SCB+PBMT (received five doses of vehicle and were submitted to PBMT); STZ+PBMT (received five doses of STZ and were submitted to PBMT). No analgesic drug was given to rats during the entire study.

2.2 Type-1 diabetes induction through multiple streptozotocin low-doses

The type-1 diabetes induction was performed according to previous studies from our group (Athie et al., 2018; Teixeira et al., 2019; Vieira et al., 2019), consisting in a low-dose of streptozotocin (25 mg/kg) [STZ; N-(Methylnitrosocarbamoyl)- α -D-glucosamine; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA], diluted in vehicle (0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.5)) intraperitoneally (i. p.) administered once a day, during five consecutive days (STZ and STZ+PBMT groups). The same dose of vehicle was injected in control animals (SCB and SCB+PBMT groups). Volume of daily injections ranged from 50 to 62.5 μ L, according to rats' weight. Blood glucose measurements from the tail vein were performed with aid of an Accu-Chek Sensor Comfort (Roche Diagnostics®, Germany). The development of hyperglycemia and the rats' body mass were monitored at days 0, 7, 14, 21, 24, and 28 after starting the STZ or vehicle injections.

2.3 Mechanical withdrawal thresholds by electronic von Frey test

To monitor the development of hyperalgesia, mechanical withdrawal thresholds were determined by applying the electronic von Frey test (Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brazil) with a polypropylene pipette tip adapted to a hand-held force transducer with crescent pressure in the plantar surface of the right and left rats' hind paws. The equipment transduces automatically the pressure applied to the paw mid-plantar surface into gram-force (g) once the paw is withdrawn. Rats were randomly placed into individual plastic cages with a metal mesh floor, followed by 30 minutes of acclimatization prior the test. Electronic von Frey tests were applied to all experimental groups at 0, 7, 14, 21, 24, and 28 days after starting the STZ or vehicle injections, always in the mid-morning period, by a blind-examiner to the groups and treatment. For the STZ+PBMT group, an additional analysis was done at 19 days after starting the STZ injections, to select only hyperalgesic rats for the PBMT exposure.

2.4 Photobiomodulation therapy through low-level laser irradiation (904 nm)

Rats from SCB+PBMT and STZ+PBMT groups were submitted to low-level laser irradiation during eight days (from the 21st to the 28th day after STZ or vehicle injections), once a day, always in the morning. For STZ+PBMT group, only hyperalgesic rats were considered to receive the laser treatment, once in our diabetic neuropathy model, about 20 % of the rats receiving STZ injections did not become hyperalgesic (data not shown). PBMT through low-level laser irradiation was performed with an Endophoton LLT1307 (KLD Biosistemas Equip. Elet. Ltda®, Amparo, SP, Brazil) class IIIB laser device. Rats were anesthetized by Isoflurane (3 %) (Cristália®, Itapira, Brazil) and the laser irradiation was

applied directly on the rat dorsal shaved skin, a single point between L4/L5 spine levels, bilaterally. Laser parameters are described in Table 1.

Table 1. PBMT parameters. All laser parameters used for PBMT followed the WALT (World Association for Laser Therapy) recommendations [63].

Laser	Wavelength	Power	Output	Irradiance
GaAs	904 nm	70 mW	0.001 cm ²	7000 mW/cm ²
Emission	Total energy	Time	Contact	Treated area
Continuous	2.03 J	29'' per point	Direct	~ 1.0 cm ²

GaAs = Gallium-Arsenide; nm = nanometers; mW = milliWatts; J = Joule; (") = seconds; cm² = square centimeters; mW/cm² = milliWatts per square centimeter.

2.5 DRG collection, tissue preparation and homogenization

For the analyzes of inflammatory cytokines and MAPK gene expression, rats were anesthetized under Isoflurane (3 %) (Cristália®, Itapira, Brazil) and humanely euthanized. After dissection, L4 and L5 DRG were collected, snap-frozen in liquid nitrogen (-196.15 °C), and then stored at -80 °C for posterior homogenization. To the DRG samples for ELISA immunoassays was added RIPA Lysis and Extraction Buffer (Thermo Scientific™), containing sodium orthovanadate, protease inhibitor, and PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) (Thermo Scientific™). Samples were placed in a FastPrep® homogenizer (MP Biomedicals™) and then were shaken at 4 °C (5 x 20 seconds) between 5 minutes intervals. After that, homogenized-DRG were kept under continuous agitation during 3 hours at 4 °C and then centrifuged at 12,000 rpm during 15 minutes at 4 °C. The resulting supernatant was transferred to a new tube. Protein concentrations were measured through the Bradford assay [64].

For MAPK gene expression through real-time RT-qPCR, DRG were fragmented and homogenized in TRIzol® (Invitrogen Life Technologies™, USA) (1 mL/mg), for isolating the total RNA, according to the manufacturer's instructions. To the homogenate were added 0.2 mL of chloroform (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), and after 3 minutes resting at room temperature, it was centrifuged at 12,000 rpm for 15 minutes at 4 °C. Aqueous phase was transferred to a new tube, in which were added 0.5 mL of isopropanol. After new centrifugation, the pellet was washed by 75 % ethanol, and the total RNA was resuspended in UltraPure™ DEPC-treated water (Thermo Scientific™, USA). Total DRG RNA was

quantified using an ultra-low-volume spectrophotometer (Epoch Microplate Spectrometer, BioTek Instruments Inc., USA).

For DRG immunofluorescence, rats were anesthetized with ketamine (85 mg/kg, i. p.) and xylazine (10 mg/kg, i. p.), and then exsanguinated via cardiac perfusion (through the ascending aorta) with saline solution (0.9 % NaCl, 200 mL). After exsanguination, rats were perfused by 4 % paraformaldehyde (PFA, pH 7.4, 4 °C, 300 mL). Finished the perfusion, L4 and L5 DRG were collected and post-fixed in 4 % PFA overnight at 4 °C, followed by 48 h in 30 % sucrose at 4 °C. Individual DRG were embedded in Tissue-Tek® O.C.T. compound (Sakura® Finetek, CA, USA) and 14 µm non-serial sections were made on a cryostat (Leica Biosystems, Germany) using gelatinized slides.

2.6 ELISA immunoassay for measure the cytokines concentrations (IL-1 β , TNF- α , and IL-10)

The levels of pro- (IL-1 β and TNF- α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). For IL-1 β and TNF- α , were used 96-well-plates through the DuoSet ELISA kit (R&D Systems DY501, MN, USA), and the results were expressed in picograms per milliliter (pg/mL). For the IL-10 (anti-inflammatory cytokine) concentrations were measured through the RayBio® Rat IL-10 ELISA kit (#ELR-IL10) (RayBiotech, Georgia, USA), and the results were expressed in picograms per milliliter per milligram of tissue (pg/mL/mg). For both ELISA immunoassay kits, were followed the manufacturer's instructions. The absorbance was determined at 450 nm on an Asys UVM 340 microplate reader (Biochrom Ltd., Cambridge, UK), and the results were obtained comparing the optical density to the standard-curve densities.

2.7 Real-time quantitative RT-PCR for MAPK gene expression

500 ng of total RNA extracted from L4 and L5 DRG were subjected to cDNA synthesis (SuperScript™ VILOTM cDNA Synthesis Kit, Invitrogen Life Technologies™, USA) according to manufacturer's protocol. Specific primers for p38-MAPK, ERK1/2, JNK, Arfgef1, and Serpinb6 genes were designed with aid of the “*Pick Primers*”, available on NCBI/Primer-blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) and synthesized commercially. Primers sequences are described in Table 2. Amplicons production was set to less than 200 base pairs to enhance the reaction efficacy. Dimers, cross-dimers, and hairpins were eliminated during primers design or were kept to a minimum. Annealing temperature was set at 60° C and the GC (guanine-cytosine) content was 50-55 %.

Table 2. 5'-3' gene sequences.

Gene	Sequence	GenBank
p-38	FW: GGCTGACATAATCCACAGGG RV: CCGGTCATTTTCGTCATCAGT	NM_031020.2
ERK1/2	FW: TGTGTTTCAGCTCAGACTTCC RV: CGTTTGATGAAGGCATGGTT	NM_133283.1
JNK	FW: TGCTACTTGCCAATCCCATC RV: AGATAACAGGGTGTCCGCTA	NM_053829.2
Arfgef1 ^(*)	FW: CAACAGGTTTAAAGCTCACGCA RV: TCCTGTTTCAGGTGGTTGTGA	NM_001277056.1
Serpinb6 ^(*)	FW: GAGTCTAGGGTACGTTCTGCTG RV: TCCATGATGGTGAACCTGCCC	NM_199085.2

^(*) housekeeping; FW = forward; RV = reverse.

Relative gene expression analysis to an internal control index was performed by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [65]. The reactions were carried out at the StepOne Plus Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA) using SYBR Green as fluorescent signal (Power SYBRTM Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA) and 1:10 of the obtained cDNA from each sample.

2.8 DRG immunofluorescence for detection of phosphorylated MAPKs

DRG sections were incubated in 0.1 M glycine during 30 minutes, followed by a blockage with 2 % bovine serum albumin (BSA) and permeabilization in 0.2 % Triton X-100, during 1 hour at room temperature. For anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK 1/2) and anti-phospho-SAPK/JNK, an additional step was done before the 2 % BSA blocking, consisting of methanol 100 % permeabilization at -20 °C. Then, sections were incubated in 0.1 M PBS plus 0.1 % Triton-100 and 1 % BSA overnight in a humid atmosphere at 4 °C with the specific primary antibodies. The following antibodies were used: anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP[®] Rabbit mAb (1:500), Cell Signaling Technology[®] #4511; anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK 1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP[®] Rabbit mAb (1:200), Cell Signaling Technology[®] #4370; and anti-phospho-SAPK/JNK (Th183/Tyr185) (G9) Mouse mAb (1:400), Cell Signaling Technology[®] #9255. After the incubation period, the sections were washed twice in the same incubation solution (without the antibodies) and then washed 5 times in 0.1 M PBS, 5 minutes each time. Sections were then incubated with the

secondary antibodies (donkey anti-rabbit or anti-mouse Alexa 488, 1:1000, #A21206, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) diluted in the same solution of the primary antibody during 1 hour, at room temperature. After incubation, DRG sections were washed with 0.1 M PBS five times, during 5 minutes.

Nuclei were stained with 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, 0.25 µg/mL, D9542, Sigma–Aldrich, MO, USA) diluted in 0.1 M PBS, during 10 minutes at room temperature. Thus, the sections were coverslipped using Vectashield® (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Negative controls were prepared without incubation in primary antibodies to confirm that there was no non-specific binding of the secondary antibodies. Sections were firstly examined in an epifluorescence inverted microscope Leica DMI 600B coupled to a DFC360FX camera and to a Leica fluorescent light source CTR7000HS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). After confirming the positive fluorescence, the final images were obtained in a Zeiss Axio Observer Z1 LSM780-NLO (Carl Zeiss AG, Germany) confocal laser-scanning microscope, with aid of the EC Plan-Neofluar 20x/0.50 Dry and EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC objective lens, in the National Institute of Science and Photonics Technology Applied to Cellular Biology (INFABiC – UNICAMP).

2.9 Statistical analysis

For comparisons between groups and time of treatment, we used Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Other comparisons between three or more groups were made by One-way ANOVA, also followed by Bonferroni post-hoc test. For comparisons between only two groups, we used unpaired t-test. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***) were considered statistically significant. All statistical tests were performed on the GraphPad Prism® software, versions 5 and 7. Numerical values were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM).

3. Results

3.1 STZ-induced hyperglycemia and PBMT influence on metabolic parameters linked to type-1 diabetes.

The diabetes induction protocol through low-doses of STZ (five low-doses, one single dose of 25 mg/kg per day) was efficient for the installation of irreversible hyperglycemia. All rats submitted to STZ injections became hyperglycemic (> 250 mg/dL of blood glucose) after the five STZ-low doses (Figure 1, panels A and C). Control rats, which received injections of

vehicle (0.1 M sodium citrate buffer), did not become hyperglycemic. Diabetic rats also presented other characteristic metabolic alterations, such as polyuria, polyphagia, and polydipsia (data not shown). Nevertheless, all animals stayed alive during the entire study.

PBMT treatment did not influence the metabolic parameters of type-1 diabetes, such as hyperglycemia and failure in weight loss. Diabetic rats, submitted or not to PBMT (STZ and STZ+PBMT groups, respectively) showed similar levels of hyperglycemia at days 21, 24, and 28 of the experimental protocol. The same was observed regarding the rats weight, once that parameter was only dependent on the diabetic condition and not on the laser treatment. In like manner, the PBMT did not show influence over healthy rats (control, non-diabetic and non-hyperalgesic), as shown in Figure 1, panels B and C.

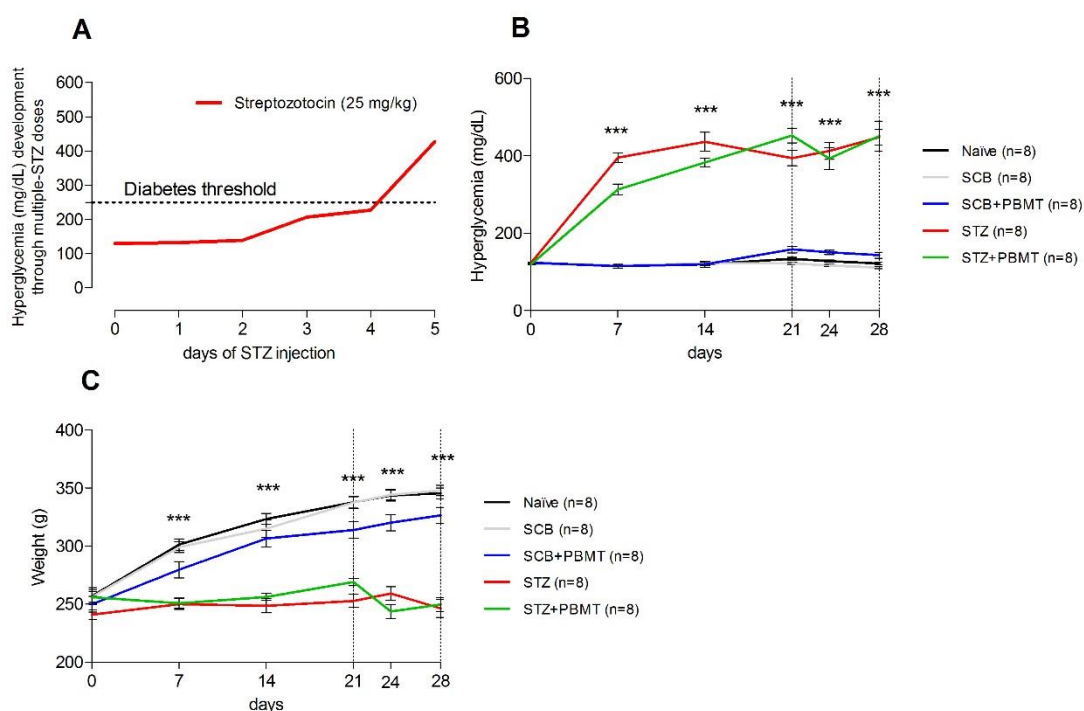


Figure 1. Streptozotocin (STZ)-induced hyperglycemia mimicking type-1 diabetes and PBMT influence over diabetes signals. (A) Average morning glycemia (red line) from rats ($n = 8$) during the protocol of diabetes induction by multiple low-doses of STZ (25 mg/kg per day). Measurements were done through a blood-drop collected from not-fed rats' tail vein at 30 minutes after every STZ injection. Between the 4th and the 5th day of the low-doses STZ protocol, rats reached the established diabetes threshold (dotted black line) in an irreversible hyperglycemic condition. (B) Rats from STZ (red line) and STZ+PBMT (green line) groups showed high levels of hyperglycemia, above diabetic threshold (glucose > 250 mg/dL), at 7, 14, 21, 24, and 28 days of the experimental protocol. PBMT showed no influence on glycemic levels. (C) Besides hyperglycemia, rats from STZ (red line) and STZ+PBMT (green line) groups stopped gaining weight after the installation of diabetes. PBMT showed no influence on rats' weight. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Data are

expressed as mean $\pm$ S.E.M.; symbol (***) means $p < 0.001$; vertical dotted black lines indicate the PBMT period (21st to 28th days).

3.2 Anti-hyperalgesic effect promoted by PBMT on STZ-induced diabetic neuropathy

As cited on Materials and Methods, about 20 % of the diabetic rats do not develop hyperalgesia in our diabetic neuropathy model. Thus, an additional von Frey test was performed at the 19th day, i.e., before starting the PBMT protocol (from the 21st to the 28th day) to select the hyperalgesic rats for the treatment. At the 21st day, after the first PBMT session, there was no reduction in the mechanical hyperalgesia. However, at the 24th and 28th days, we observed a significant reduction ($p < 0.001$) in the intensity of hyperalgesia in the STZ+PBMT group, when compared to STZ group, characterizing an anti-hyperalgesic effect promoted by PBMT (One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test). Nonetheless, the PBMT applied to control rats (SCB+PBMT) did not change the mechanical withdrawal thresholds, which were the same as the SCB (vehicle) and Naïve (intact) groups (Figure 2, panels A and B).

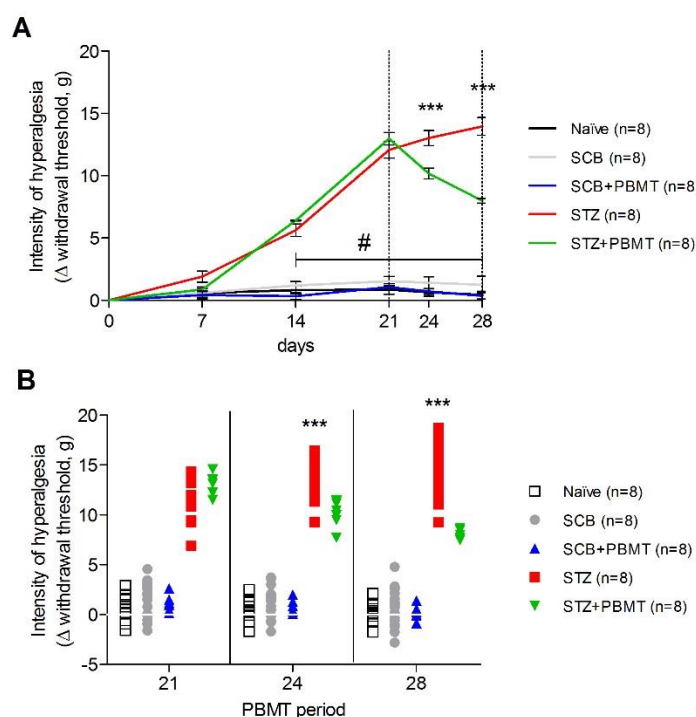


Figure 2. PBMT effects on diabetic neuropathic hyperalgesia. (A) Data from mechanical withdrawal thresholds (g) (intensity of hyperalgesia) show that PBMT applied between the 21st and the 28th days, reduced significantly the intensity of hyperalgesia of the STZ+PBMT group (green line) in comparison with the STZ group (red line), at the 24th and the 28th days (4 and 8 cumulative PBMT sessions, respectively), with no influence after only one PBMT session (21st day). Rats from control groups (Naïve; SCB; SCB+PBMT) did not

develop mechanical hyperalgesia. **(B)** Graph emphasizing the PBMT anti-hyperalgesic effect during the period between the 21st and the 28th day, which are considered the mean peaks of hyperalgesia. Rats from STZ+PBMT group (green symbols) showed a significant reduction in the intensity of hyperalgesia compared to STZ group (red symbols) and a low variability intra-group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M.; symbol (***) means significant difference ($p < 0.001$) between STZ and STZ+PBMT groups; symbol (#) means significant difference ($p < 0.001$) between STZ-induced groups (STZ and STZ+PBMT) in comparison to control groups (Naïve; SCB; SCB+PBMT).

3.3 PBMT was able to reduce the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines

DRG from diabetic neuropathic rats without PBMT treatment (STZ group) showed increased concentrations of IL-1 β and, curiously, IL-10, but not TNF- α . It was observed a significant increase of IL-1 β in the STZ group compared to all the others ($p < 0.05$), and especially to the STZ+PBMT group ($p < 0.05$), as shown in Figure 3, panel A. As for IL-1 β , the levels of IL-10 (an anti-inflammatory cytokine) showed increased levels in the STZ group, but not in the controls ($p < 0.05$) or in the STZ+PBMT group ($p < 0.05$) (Figure 3, panel B). Differently, levels of TNF- α showed no alterations caused by the diabetic neuropathy (STZ group), which were the same for control groups, excepted for STZ+PBMT group, which showed a significant reduction ($p < 0.01$) in the concentration of TNF- α , compared to STZ (without PBMT) (One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test) (Figure 3, panel C).

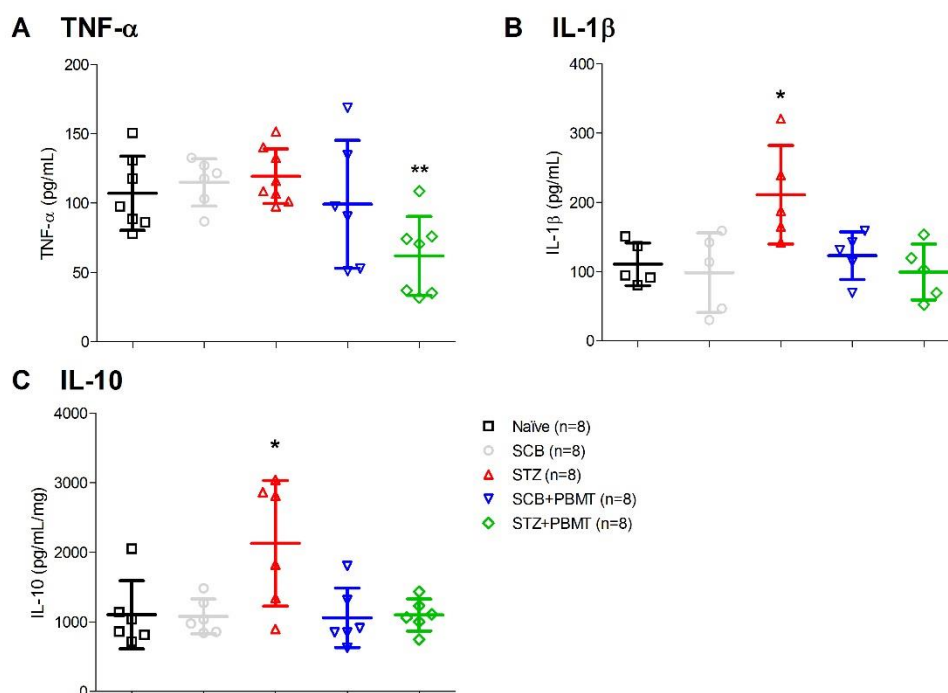


Figure 3. Effects of PBMT over the DRG levels of pro- (TNF- α , and IL-1 β) and anti-inflammatory cytokines (IL-10). (A) There was no increase in the levels of TNF- α (pg/mL) in the STZ group (red symbols). STZ+PBMT group (green symbols) showed a significant reduction ($p < 0.01$) in the levels of TNF- α (pg/mL) in comparison to all the other groups. (B) For the levels of IL-1 β (pg/mL), there was a significant increase ($p < 0.05$) in the STZ group (red symbols) in comparison with all the other groups, including the STZ+PBMT group (green symbols), which means that the treatment with PBMT was able to reduce the levels of IL-1 β (pg/mL) in the DRG of neuropathic hyperalgesic rats. One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M.; symbols (**) and (*) mean $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively.

3.4 Influence of PBMT on MAPK gene- and protein-expression

Previous to the Real-Time quantitative PCR experiments, primers for target- (p38, ERK1/2, and JNK) and housekeeping-genes (endogenous control, Arfgef1 and Serpinb6) were tested regarding their efficacy by the standard curve construction. It was done through serial dilutions of Naïve cDNA (1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64) and fixed primer concentrations (100 nM). It was observed high efficiency for all tested primers, including the endogenous controls (99.9; r^2 0.98) (data not shown). Thus, the expression of target-genes was normalized by the mean values of Ct (cycle threshold) from Arfgef1 and Serpinb6 gene expression.

We observed a significant increase on the gene expression of p38 in the STZ group compared to Naïve and SCB (vehicle) groups ($p < 0.01$; $p < 0.001$, respectively) (One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test). In addition, the p38 expression in the hyperalgesic group (STZ) was significantly higher in comparison to the laser-exposed ones, STZ+PBMT and SCB+PBMT ($p < 0.05$; $p < 0.001$, respectively), as shown in Figure 4, panel

A (One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test). There were no differences in the expression of ERK1/2 and JNK between the groups (Figure 4, panels B and C).

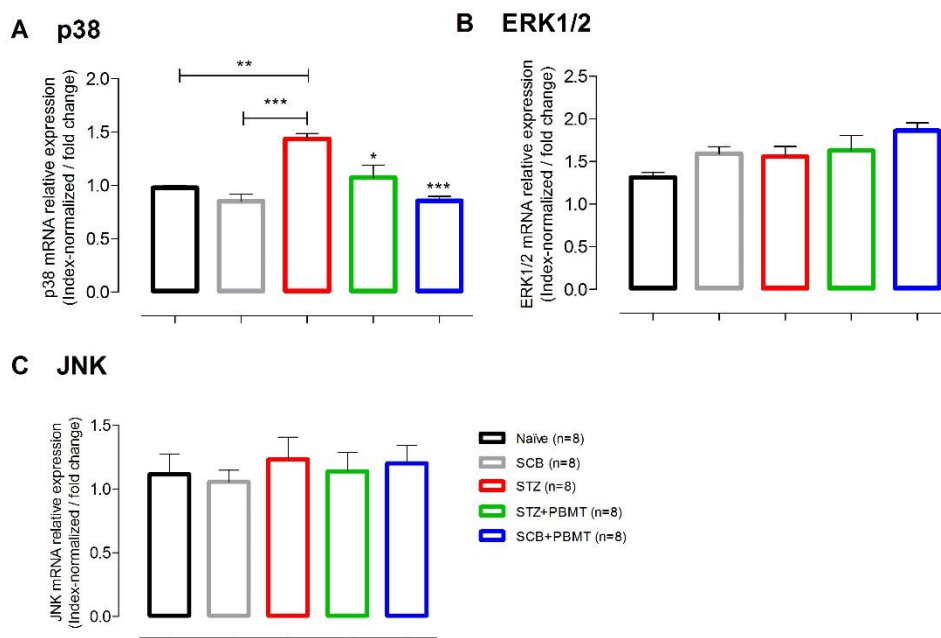


Figure 4. Quantitative gene expression of MAPK codifying genes. Gene expression values of p38 (A), ERK1/2 (B), and JNK (C) were index-normalized by the endogenous controls (Arfgef1 and Serpinb6). STZ group showed a higher gene expression of p38 in comparison to all the other groups, including STZ+PBMT (A). For ERK1/2 and JNK genes, there was no difference between the groups. One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M.; symbols (*), (**), and (***) mean $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively.

Through the immunofluorescence experiments we also observed, qualitatively, a higher increase in the expression of activated MAPK, especially p-p38, in the STZ group (Figure 5, panels e and f). The fluorescence regarding p-38 phosphorylation in the hyperalgesic rats was reduced by the PBMT treatment, as shown in the STZ+PBMT group, in which there was some p-38 activation, but in a lower number of neurons in comparison to STZ group (Figure 5, panels k-l). Also corroborating with the results of gene expression, we observed a low phosphorylation of p-ERK1/2 and p-JNK MAPKs for all the groups [Figures 6 and 7 (panels b, e, h, k, respectively)].

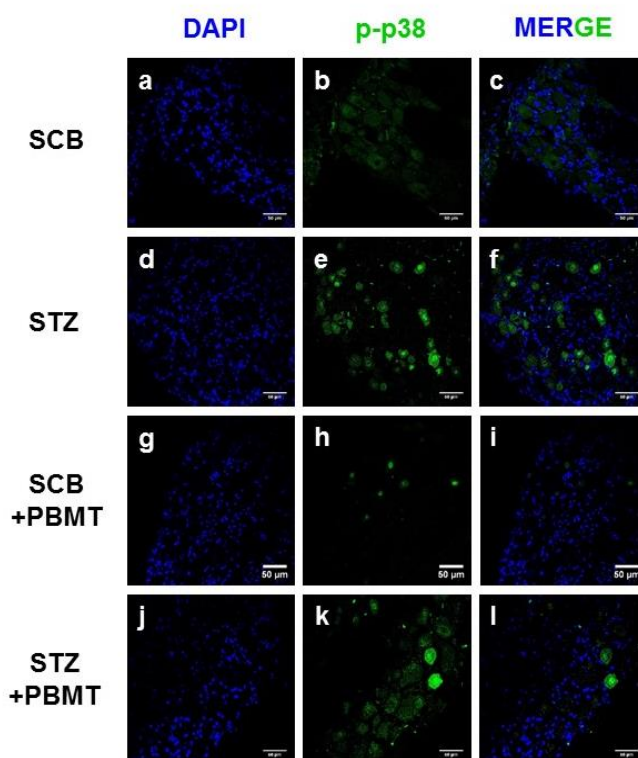


Figure 5. DRG histological characterization of p-p38 MAPK by confocal micrograph. DRG transversal sections were made in 14 μm thickness and submitted to immunofluorescence protocol for staining of endogenous p38 phosphorylation in Thr180 and Tyr182 (panels b, e, h, and k). For nuclear staining, DAPI was used (panels a, d, g, and j). Merge (DAPI + p-p38) images are also showed (panels c, f, i, and j). It is possible to observe an increased fluorescence staining regarding the expression of p-p38 in the STZ group (panel e) compared to the control groups (SCB and SCB+PBMT, panels b and h, respectively) and also to the STZ+PBMT (panel k) group. Magnification: 40x; scale bars: 50 μm .

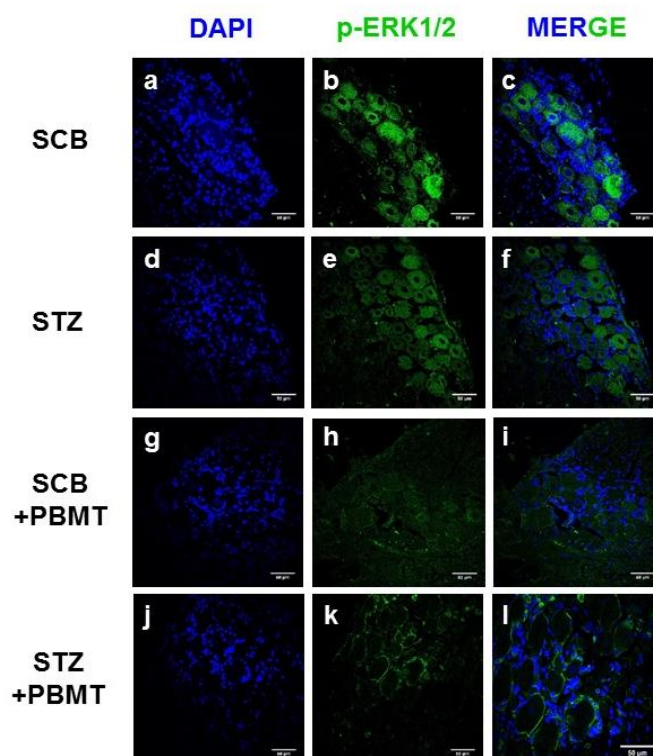


Figure 6. DRG histological characterization of p-ERK1/2 MAPK by confocal micrograph. DRG transversal sections were made in 14 μm thickness and submitted to immunofluorescence protocol for staining of ERK1/2 phosphorylation in Thr202 and Tyr204 (p44/p42) (panels b, e, h, and k). For nuclear staining, DAPI was used (panels a, d, g, and j). Merge (DAPI + p-ERK1/2) images are also showed (panels c, f, i, and j). There is low fluorescence regarding the expression of p-ERK1/2, especially for the SCB+PBMT (panel h) and STZ+PBMT (panel k) groups. Magnification: 40x; scale bars: 50 μm .

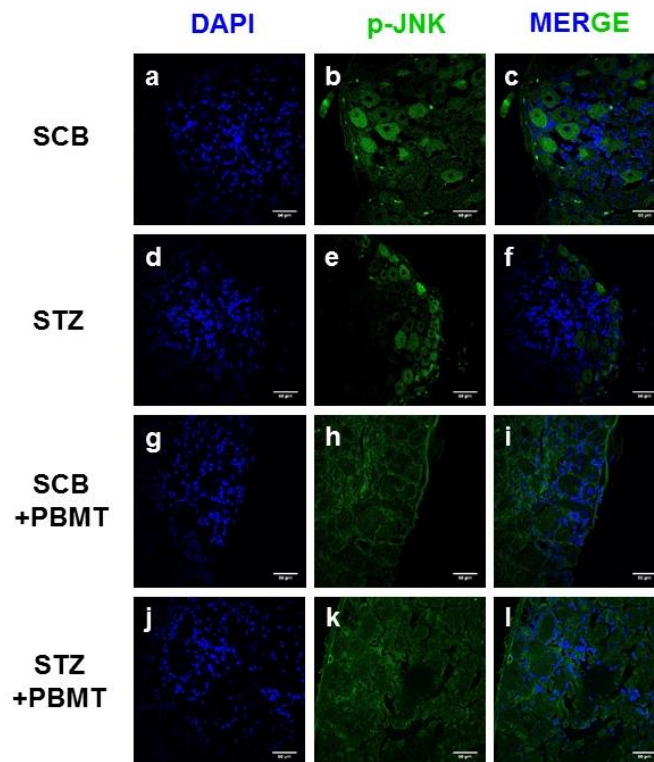


Figure 7. DRG histological characterization of p-JNK MAPK by confocal micrograph. DRG transversal sections were made in 14 μm thickness and submitted to immunofluorescence protocol for staining of endogenous p-JNK phosphorylation in Thr183 and Tyr185 (p46/p54) (panels b, e, h, and k). For nuclear staining, DAPI was used (panels a, d, g, and j). Merge (DAPI + p-JNK) images are also showed (panels c, f, i, and j). There is low fluorescence regarding the expression of p-JNK, especially for the SCB+PBMT (panel h) and STZ+PBMT (panel k) groups. Magnification: 40x; scale bars: 50 μm .

3.5 p-p38 staining co-localizes TRPV1 in DRG

Complementarily to the immunofluorescence staining of p-p38 in the DRG, we analyzed if its expression is involved to a particular type of fibers, like type-C fibers (small DRG neurons; unmyelinated; TRPV1+). We observed a co-staining of p-p38 and TRPV1+ fibers, especially in the STZ (Figure 8, panel l) and STZ+PBMT (Figure 8, panel t) groups.

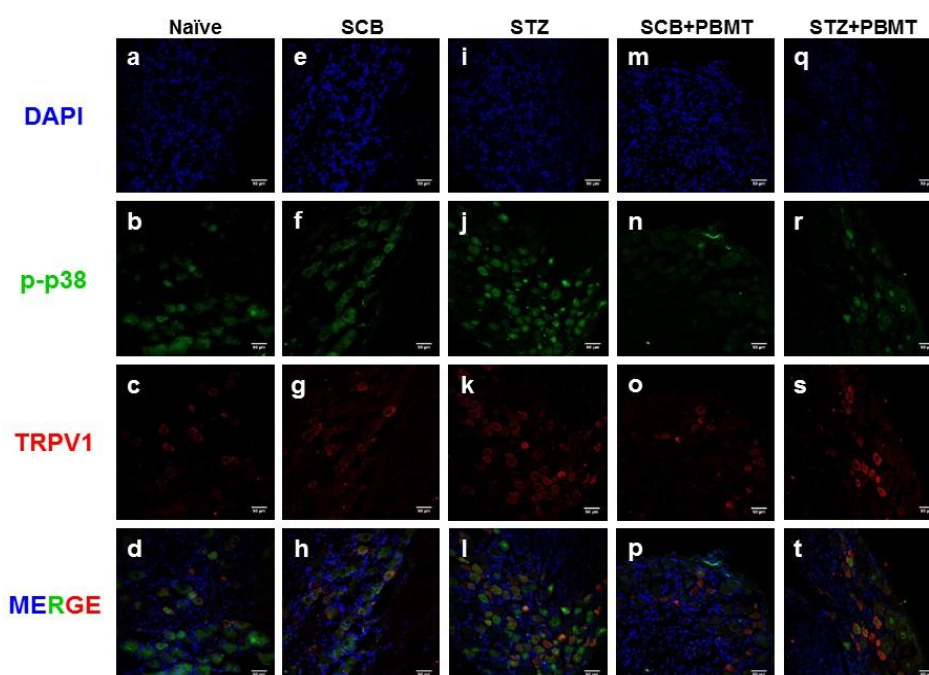


Figure 8. DRG histological characterization of p-p38 MAPK and the co-staining of TRPV1 by confocal micrograph. DRG transversal sections were made in 14 μm thickness and submitted to immunofluorescence protocol for staining of endogenous p38 phosphorylation in Thr180 and Tyr182 (panels b, e, h, and k) and TRPV1. For nuclear staining, DAPI was used (panels a, e, i, m, and q). Merge (DAPI+p-p38+TRPV1) images are also showed (panels d, h, l, p, and t). It is possible to observe an increased fluorescence a co-staining of p-p38 and TRPV1 in the STZ group (panel l) compared to the control groups (Naïve, SCB, and SCB+PBMT, panels d, h, and l, respectively). STZ+PBMT group (panel t) showed increased staining for TRPV1 and a moderate staining por p-p38 MAPK. Magnification: 40x; scale bars: 50 μm .

4. Discussion

PBMT application showed an anti-hyperalgesic effect on the neuropathic hyperalgesia induced by STZ low-doses, which was not related to altered-metabolic parameters of type-1 diabetes. Our initial idea was that the anti-hyperalgesic effect could be linked to the reduction in the concentration of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) and MAPK codifying gene- and protein-expression in the DRG.

Streptozotocin (STZ) is an antibiotic with diabetogenic activity, known for its selective capacity of killing the beta cells on pancreas, commonly used to type-1 diabetes induction in animal models [66], also for produce less STZ side effects, such as neurotoxicity [67]–[69]. Rats submitted to STZ injections show deficits in the insulin production (leading to hyperglycemia), polydipsia, and polyuria [70]. All those diabetes signals were observed on

the rats from STZ group, which characterizes a reproducible model of diabetes induction, as shown in previous studies from our group [62], [71], [72].

PBMT had no influence on the metabolic signals of diabetes. That data corroborates with the study performed by Peplow and colleagues (2012) [73], in which the PBMT (660 nm; 100 mW; 4.7-6.3 J/cm²; 20 s) applied for wound healing in diabetic patients, showed no interference neither on hyperglycemia nor on patients' metabolic status. Contrariwise, PBMT through infrared laser (810 nm; 1 J/cm²) applied by Longo (2008) [74] on the abdomen of diabetic patients caused a hypoglycemic effect.

Studies have shown that MAPK activation, in general, is linked to allodynia and hyperalgesia in different disease conditions [75]–[77]. p38-MAPK is typically activated by extracellular stress and pro-inflammatory cytokines, with a large role in the inflammatory process, once there is a significant reduction on inflammation after p38 inhibitor systemic administration [77]–[79]. It is well known that TNF- α and IL-1 β play a key role in the development and maintenance of pain after peripheral nerve injury [80]–[82]. Thus, as TNF- α and IL-1 β biosynthesis are regulated by p38, a reduction in both of them culminates in anti-inflammatory effects with a positive reflex in analgesia [78]. p38 has several proinflammatory roles, and systemically administered p38 inhibitors produce anti-inflammatory effects by reducing the synthesis of the cytokines TNF- α and IL-1 β , as well as Cox-2 induction of inflammatory cells [28], [83]. Hence, the pharmacological and/or non-pharmacological therapies that reduce the concentration of pro-inflammatory molecules might reduce the painful condition. Therefore, our data showed that PBMT promoted a reduction in the concentrations of TNF- α and IL-1 β , associated with less activation (phosphorylation) of p38, which can help explain the analgesic effect of the laser therapy. A study of 8-12 week STZ rats showed activation of all MAPKs in L4/L5 DRG, although with later activation of JNK, compared to p38 and ERK1/2 MAPKs [38].

As reported by Hsieh and collaborators (2012) [84], PBMT (660 nm; 30 mW; 9 J/cm²; 60 s) applied for the treatment of chronic pain induced by sciatic nerve constriction, caused a reduction in the concentration of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1 β , and HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α), corroborating with our results. The same reduced TNF- α levels promoted by PBMT (950 nm; 80 mW/cm²; 2.5 J/cm²) were observed in a mice model of sciatic nerve crush injury, as reported by Cidral-Filho et al. (2013) [85]. These evidences bring the discussion of high anti-inflammatory capacity of PBMT. In this regard, the anti-inflammatory effects promoted by PBMT were previously observed in carrageenan-induced inflammation in rats' paw, in which the 660 nm and 684 nm low-level lasers (30

mW; 7.5 J/cm²) reduced the edema formation and inflammatory cell migration at 4 h after carrageenan injections [86].

The modulation over the MAPK activation caused by PBMT (He-Ne; 632.8 nm) was studied by Shefer and colleagues (2001) [87] in skeletal muscle cells, which showed increased levels of ERK1/2 under laser irradiation, and no effect over p38 and JNK expression. Aleksic and collaborators (2010) [88] also verified activation of ERK1/2 in osteoblast cell cultures submitted to laser irradiation (Er: YAG) with no effect on p38 and JNK. According to Ji et al. (2002) [83], the p38 activation in the DRG is initiated by retrograde transport of NGF release from inflamed tissue and acts to increase translation and transport of TRPV1 to the peripheral nociceptor terminal, where it contributes to the maintenance of inflammatory heat pain hypersensitivity.

5. Conclusion

PBMT might represent a novel therapeutic approach for the treatment of diabetic neuropathic hyperalgesia, based on its anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects.

6. Compliance with ethical standards

Conflict of interest: The authors declare they have no conflict of interest.

7. Acknowledgements

This study was financed by São Paulo Research Foundation (FAPESP) (Grants #2014/25153-7; #2015/12673-5; #2018/05108-8) and by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). We wish to thank the National Institute of Science and Photonics Technology Applied to Cellular Biology (INFABIC) for support on imaging acquisition.

8. References

- [1] E. L. Feldman, K. Nave, T. S. Jensen, and D. L. H. Bennett, “Review New Horizons in Diabetic Neuropathy.” *Neuron*, vol. 93, no. 6, pp. 1296–1313, 2017, doi: 10.1016/j.neuron.2017.02.005.
- [2] P. D. . Brian C. Callaghan, M.D.(1), Hsinlin Cheng, M.D., Ph.D.(1), Catherine L. Stables, Ph.D.(1), Andrea L. Smith, M.S.(1), and Eva L. Feldman, M.D., “Diabetic neuropathy: Clinical manifestations and current treatments,” *Lancet Neurol*, vol. 11, no. 6, pp. 521–534, 2014, doi: 10.1016/S1474-4422(12)70065-0.Diabetic.

- [3] T. S. Jensen and N. B. Finnerup, “Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms,” *Lancet Neurol.*, vol. 13, no. 9, pp. 924–935, 2014, doi: 10.1016/S1474-4422(14)70102-4.
- [4] A. Truini, L. Garcia-larrea, and G. Cruccu, “Reappraising neuropathic pain in humans — how symptoms help disclose mechanisms,” *Nat. Publ. Gr.*, pp. 1–11, 2013, doi: 10.1038/nrneurol.2013.180.
- [5] R. A. Gandhi and D. Selvarajah, “Review Article Understanding and treating painful diabetic neuropathy: time for a paradigm shift,” pp. 771–777, 2015, doi: 10.1111/dme.12755.
- [6] K. Harris, C. Boland, L. Meade, and D. Battise, “Adjunctive therapy for glucose control in patients with type 1 diabetes,” *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.*, vol. Volume 11, pp. 159–173, 2018, doi: 10.2147/DMSO.S141700.
- [7] S. Yagihashi, H. Mizukami, and K. Sugimoto, “Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go?” *J. Diabetes Investig.*, vol. 2, no. 1, pp. 18–32, 2011, doi: 10.1111/j.2040-1124.2010.00070.x.
- [8] A. Y. W. Lee and S. S. M. Chung, “Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract,” pp. 23–30, 2018.
- [9] M. Brownlee, “biology of diabetic complications,” vol. 414, no. December, pp. 813–820, 2001.
- [10] L. Yan, “Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress,” vol. 2014, 2014.
- [11] A. K. Schreiber et al., “Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment,” vol. 6, no. 3, pp. 432–444, 2015, doi: 10.4239/wjd.v6.i3.432.
- [12] P. J. Thornalley, “Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options,” vol. 50, 2002.
- [13] J. Juranek, R. Ray, M. Banach, and V. Rai, “Receptor for advanced glycation end-products in neurodegenerative diseases a bad reputation,” 2015, doi: 10.1515/revneuro-2015-0003.
- [14] D. A. Greene, M. J. Stevens, I. Obrosova, and E. L. Feldman, “Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy,” 1999.
- [15] R. Pop-busui, A. Sima, and M. Stevens, “Diabetic neuropathy and oxidative stress,” no. December 2005, pp. 257–273, 2006, doi: 10.1002/dmrr.625.
- [16] D. N. Ishii and S. B. Lupien, “Insulin-Like Growth Factors Protect Against Diabetic Neuropathy: Effects on Sensory Nerve Regeneration in Rats,” vol. 144, no. 1 995, pp. 138–144, 1994.

- [17] P. Fernyhough and N. A. Calcutt, "Cell Calcium Abnormal calcium homeostasis in peripheral neuropathies," *Cell Calcium*, vol. 47, no. 2, pp. 130–139, 2010, doi: 10.1016/j.ceca.2009.11.008.
- [18] D. Koya, K. Kuboki, and G. L. King, "Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats" vol. 1, no. Iv, 1997.
- [19] E. Akude, E. Zhrebetskaya, S. K. R. Chowdhury, D. R. Smith, R. T. Dobrowsky, and P. Fernyhough, "Diminished Superoxide Generation Is Associated With Respiratory Chain Dysfunction and Changes in the Mitochondrial Proteome of Sensory Neurons From Diabetic Rats," vol. 60, no. January, 2011, doi: 10.2337/db10-0818.E.A.
- [20] S. K. R. Chowdhury et al., "Mitochondrial Respiratory Chain Dysfunction in Dorsal Root Ganglia of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats and Its Correction by Insulin Treatment," vol. 59, no. April, 2010, doi: 10.2337/db09-1299.
- [21] D. S. Younger, G. Rosoklija, A. P. Hays, and N. Latov, "Diabetic peripheral neuropathy: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of sural nerve biopsies," no. June, pp. 722–727, 1996.
- [22] D. R. Tomlinson and N. J. Gardiner, "2007 PNS Plenary lecture and review. Diabetic neuropathies: components of etiology," vol. 121, pp. 112–121, 2008.
- [23] J. Satoh, S. Yagihashi, and T. Toyota, "The Possible Role of Tumor Necrosis Factor- α in Diabetic Polyneuropathy," no. C, pp. 65–71, 2003, doi: 10.1080/15438600390228496.
- [24] S. Yamagishi, S. Ogasawara, H. Mizukami, N. Yajima, and R. Wada, "Correction of protein kinase C activity and macrophage migration in peripheral nerve by pioglitazone, peroxisome proliferator activated- c -ligand, in insulin-deficient diabetic rats," pp. 491–499, 2008, doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05050.x.
- [25] Y. Du et al., "Effects of p38 MAPK Inhibition on Early Stages of Diabetic Retinopathy and Sensory Nerve Function," vol. 51, no. 4, pp. 2158–2164, 2010, doi: 10.1167/iovs.09-3674.
- [26] R. Seger and E. Krebs, "The MAPK signaling cascade," 1995.
- [27] T. S. Lewis, P. S. Shapiro, and N. G. Ahn, "Signal Transduction through MAP Kinase Cascades," 1993.
- [28] C. Widmann, S. Gibson, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson, "Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module from Yeast to Human," vol. 79, no. 1, 1999.

-
- [29] K. Obata and K. Noguchi, "MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity," *Life Sci.*, vol. 74, no. 21, pp. 2643–2653, 2004, doi: 10.1016/j.lfs.2004.01.007.
- [30] G. L. R. Johnson, "Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases Author (s): Gary L. Johnson and Razvan Lapadat Source: Science, New Series, Vol. 298, No. 5600 (Dec. 6, 2002), pp. 1911-1912 Published by: "American" vol. 298, no. 5600, pp. 1911–1912, 2002.
- [31] M. Krishna and H. Narang, "Review The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple," vol. 65, pp. 3525–3544, 2008, doi: 10.1007/s00018-008-8170-7.
- [32] S. Yang, A. D. Sharrocks, and A. J. Whitmarsh, "Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades," vol. 320, pp. 3–21, 2003, doi: 10.1016/S0378-1119(03)00816-3.
- [33] C. Bonny, T. Borsello, and A. Zine, "Targeting the JNK Pathway as a Therapeutic Protective Strategy for Nervous System Diseases," vol. 67, pp. 57–67, 2005.
- [34] M. Tsuda, H. Ueno, A. Kataoka, H. Tozaki-saitoh, and K. Inoue, "Activation of Dorsal Horn Microglia Contributes to Diabetes-Induced Tactile Allodynia via Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Signaling," vol. 386, no. September 2007, pp. 378–386, 2008, doi: 10.1002/glia.
- [35] R. Wodarski, A. K. Clark, J. Grist, F. Marchand, and M. Malcangio, "Gabapentin reverses microglial activation in the spinal cord of streptozotocin-induced diabetic rats," *Eur. J. Pain*, vol. 13, no. 8, pp. 807–811, 2009, doi: 10.1016/j.ejpain.2008.09.010.
- [36] C. Galloway and M. Chattopadhyay, "Increases in inflammatory mediators in DRG implicate in the pathogenesis of painful neuropathy in Type 2 diabetes," *Cytokine*, vol. 63, no. 1, pp. 1–5, 2013, doi: 10.1016/j.cyto.2013.04.009.
- [37] A. M. Manning and R. J. Davis, "Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold?" vol. 2, no. July, pp. 554–565, 2003, doi: 10.1038/nrd1132.
- [38] T. Purves, A. Middlemas, S. Agthong, E. B. Jude, and D. R. A, "A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy."
- [39] S. A. Price, S. Agthong, A. B. Middlemas, and D. R. Tomlinson, "Mitogen-Activated Protein Kinase p38 Mediates Reduced Nerve Conduction Velocity in Experimental Diabetic Neuropathy," pp. 1851–1856, 2004.
- [40] M. Tsuda, A. Mizokoshi, and Y. Shigemoto-mogami, "Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Spinal Hyperactive Microglia Contributes to Pain

Hypersensitivity Following Peripheral,” vol. 95, no. July 2003, pp. 89–95, 2004, doi: 10.1002/glia.10308.

[41] L. Daulhac et al., “Diabetes-Induced Mechanical Hyperalgesia Involves Spinal Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Neurons and Microglia via N -Methyl- D-Aspartate-Dependent Mechanisms,” vol. 70, no. 4, pp. 1246–1254, 2006, doi: 10.1124/mol.106.025478.which.

[42] Z. Piao et al., “Activation of glia and microglial p38 MAPK in medullary dorsal horn contributes to tactile hypersensitivity following trigeminal sensory nerve injury,” vol. 121, pp. 219–231, 2006, doi: 10.1016/j.pain.2005.12.023.

[43] J. Xu, W. Xin, X. Wei, C. Wu, and Y. Ge, “p38 activation in uninjured primary afferent neurons and in spinal microglia contributes to the development of neuropathic pain induced by selective motor fiber injury,” vol. 204, pp. 355–365, 2007, doi: 10.1016/j.expneurol.2006.11.016.

[44] H. Cheng and E. L. Feldman, “Bidirectional Regulation of p38 Kinase and c-Jun N-terminal Protein Kinase by Insulin-like Growth Factor-I *,” vol. 273, no. 23, pp. 14560–14565, 1998.

[45] C. Cheng and D. W. Zochodne, “Sensory neurons with activated caspase-3 survive long-term experimental diabetes,” *Diabetes*, vol. 52, no. 9, pp. 2363–2371, 2003, doi: 10.2337/diabetes.52.9.2363.

[46] A. M. Vincent, “Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons,” *FASEB J.*, vol. 24, pp. 1–24, 2005, doi: 10.1096/fj.04-2513fje.

[47] K. J. Way, N. Katai, and G. L. King, “Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications,” 2001.

[48] J. Eichberg, “Protein kinase c changes in diabetes: is the concept relevant to neuropathy?” vol. 50, 2002.

[49] R. M. Pabbidi, S. Yu, S. Peng, R. Khardori, M. E. Pauza, and L. S. Premkumar, “sensitivity,” vol. 17, pp. 1–17, 2008, doi: 10.1186/1744-8069-4-9.

[50] S. Passarella and T. Karu, “Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 140, pp. 344–358, 2014, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.07.021.

- [51] S. R. Tsai and M. R. Hamblin, “Biological effects and medical applications of infrared radiation,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 170, no. December 2016, pp. 197–207, 2017, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.04.014.
- [52] J. J. Anders, R. J. Lanzafame, and P. R. Arany, “Low-Level Light/Laser Therapy Versus Photobiomodulation Therapy,” *Photomed. Laser Surg.*, vol. 33, no. 4, pp. 183–184, 2015, doi: 10.1089/pho.2015.9848.
- [53] H. Chung, T. Dai, S. K. Sharma, Y.-Y. Huang, J. D. Carroll, and M. R. Hamblin, “The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 40, no. 2, pp. 516–533, 2012, doi: 10.1007/s10439-011-0454-7.
- [54] M. R. Hamblin, “Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 94, no. 2, pp. 199–212, 2018, doi: 10.1111/php.12864.
- [55] C. C. Alcântara, D. Gigo-Benato, T. F. Salvini, A. L. R. Oliveira, J. J. Anders, and T. L. Russo, “Effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute neural recovery and inflammation-related gene expression after crush injury in rat sciatic nerve,” *Lasers Surg. Med.*, vol. 45, no. 4, pp. 246–252, 2013, doi: 10.1002/lsm.22129.
- [56] R. T. Chow, M. I. Johnson, R. A. Lopes-Martins, and J. M. Bjordal, “Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic review and meta-analysis of randomised placebo or active-treatment controlled trials,” *Lancet*, vol. 374, no. 9705, pp. 1897–1908, 2009, doi: 10.1016/S0140-6736(09)61522-1.
- [57] W. F. Vieira et al., “Vibrational spectroscopy of muscular tissue intoxicated by snake venom and exposed to photobiomodulation therapy,” *Lasers Med. Sci.*, 2017, doi: 10.1007/s10103-017-2389-1.
- [58] W. F. Vieira, B. Kenzo-Kagawa, J. C. Cogo, V. Baranauskas, and M. A. Da Cruz-Höfling, “Low-level laser therapy (904 nm) counteracts motor deficit of mice hind limb following skeletal muscle injury caused by snakebite-mimicking intramuscular venom injection,” *PLoS One*, vol. 11, no. 7, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0158980.
- [59] J. M. Bjordal, C. Couppé, R. T. Chow, J. Tunér, and E. A. Ljunggren, “A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders,” 2003, doi: 10.1016/S0004-9514(14)60127-6.
- [60] D. Gigo-Benato, “Effects of 660 and 780 nm Low-Level Laser Therapy on Neuromuscular Recovery After Crush Injury in Rat Sciatic Nerve,” vol. 682, no. September, pp. 673–682, 2010, doi: 10.1002/lsm.20978.
- [61] W. Posten, “Low-Level Laser Therapy for Wound Healing: Mechanism and Efficacy.”

- [62] W. F. Vieira, S. F. de Magalhães, F. H. Farias, A. A. de Thomaz, and C. A. Parada, “Raman spectroscopy of dorsal root ganglia from streptozotocin-induced diabetic neuropathic rats submitted to photobiomodulation therapy,” *J. Biophotonics*, vol. 12, no. 11, Nov. 2019, doi: 10.1002/jbio.201900135.
- [63] WALT, “WALT recommended treatment doses x LLLT,” p. 2010, 2010.
- [64] M. M. Bradford, “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding,” vol. 254, pp. 248–254, 1976.
- [65] J. Vandesompele, K. De Preter, B. Poppe, N. Van Roy, and A. De Paepe, “Accurate normalization of real-time quantitative RT -PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes,” pp. 1–12, 2002.
- [66] K. K. Wu and Y. Huan, “Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats,” no. March, pp. 1–14, 2008, doi: 10.1002/0471141755.ph0547s40.
- [67] H. Kolb, “Mouse Models of Insulin Dependent Diabetes: Low-Dose Streptozocin-Induced Diabetes and Nonobese Diabetic (NOD) Mice,” vol. 778, 1987.
- [68] V. Kolb-bachofen, S. Epstein, U. Kiesel, and H. Kolb, “Low-Dose Streptozocin-Induced Diabetes in Mice Electron Microscopy Reveals Single-Cell Insulitis Before Diabetes Onset,” vol. 37, no. January, pp. 21–27, 1988.
- [69] L. G. Weide and P. E. Lacy, “Low-Dose Streptozocin-Induced Autoimmune Diabetes in Islet Transplantation Model,” vol. 40, no. March, pp. 1157–1162, 1991.
- [70] B. L. Furman, “Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats.,” *Curr. Protoc. Pharmacol.*, vol. 70, no. September, pp. 5.47.1-5.47.20, 2015, doi: 10.1002/0471141755.ph0547s70.
- [71] J. M. Teixeira et al., “Diabetes-induced Neuropathic Mechanical Hyperalgesia Depends on P2X4 Receptor Activation in Dorsal Root Ganglia,” no. December, 2018, doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.12.003.
- [72] M. C. P. Athie et al., “Transcriptome analysis of dorsal root ganglia’s diabetic neuropathy reveals mechanisms involved in pain and regeneration.,” *Life Sci.*, vol. 205, no. May, pp. 54–62, 2018, doi: 10.1016/j.lfs.2018.05.016.
- [73] P. V Peplow, T.-Y. Chung, and G. D. Baxter, “Laser photostimulation (660 nm) of wound healing in diabetic mice is not brought about by ameliorating diabetes.,” *Lasers Surg. Med.*, vol. 44, no. 1, pp. 26–9, 2012, doi: 10.1002/lsm.21133.
- [74] L. Longo, “The Role of Laser in Diabetes Management,” pp. 215–220, 2008.

-
- [75] L. Chang and M. Karin, "Mammalian MAP kinase signalling cascades.pdf," pp. 37–40, 2001.
- [76] A. Ciruela, A. K. Dixon, S. Bramwell, M. I. Gonzalez, and K. Lee, "Identification of MEK1 as a novel target for the treatment of neuropathic pain," pp. 751–756, 2003, doi: 10.1038/sj.bjp.0705103.
- [77] A. Galan, F. Cervero, and J. M. A. Laird, "referred hyperalgesia in a murine model of visceral pain," vol. 116, pp. 126–134, 2003.
- [78] S. Kumar, J. Boehm, and J. C. Lee, "p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases," 2003, doi: 10.1038/nrd1177.
- [79] D. L. Boyle et al., "Regulation of Peripheral Inflammation by Spinal p38 MAP Kinase in Rats," vol. 3, no. 9, 2006, doi: 10.1371/journal.pmed.0030338.
- [80] W. A. Verri, T. M. Cunha, C. A. Parada, S. Poole, F. Q. Cunha, and S. H. Ferreira, "Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development?" vol. 112, pp. 116–138, 2006, doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.04.001.
- [81] J. Scholz and C. J. Woolf, "glia and disease" The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia," vol. 10, no. 11, pp. 1361–1368, 2007, doi: 10.1038/nn1992.
- [82] L. R. Watkins, M. R. Hutchinson, E. D. Milligan, and S. F. Maier, "Listening and talking to neurons: Implications of immune activation for pain control and increasing the efficacy of opioids," vol. 56, 2007, doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.06.006.
- [83] R. R. Ji and M. R. Suter, "p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain," *Mol. Pain*, vol. 3, pp. 1–9, 2007, doi: 10.1186/1744-8069-3-33.
- [84] Y. L. Hsieh, L. W. Chou, P. L. Chang, C. C. Yang, M. J. Kao, and C. Z. Hong, "Low-level laser therapy alleviates neuropathic pain and promotes function recovery in rats with chronic constriction injury: Possible involvements in hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α)," *J. Comp. Neurol.*, vol. 520, no. 13, pp. 2903–2916, 2012, doi: 10.1002/cne.23072.
- [85] F. J. Cidral-Filho et al., "Light-emitting diode therapy induces analgesia and decreases spinal cord and sciatic nerve tumour necrosis factor- α levels," vol. 17, pp. 1193–1204, 2013, doi: 10.1002/j.1532-2149.2012.00280.x.
- [86] R. Albertini, A. B. Villaverde, F. Aimbire, M. A. C. Salgado, and J. M. Bjordal, "Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (60 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema," vol. 89, pp. 50–55, 2007, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2007.08.005.

- [87] G. Shefer, U. R. I. Oron, A. Irintchev, A. Wernig, and O. Halevy, “Skeletal Muscle Cell Activation by Low-Energy Laser Irradiation: A Role for the MAPK / ERK Pathway,” vol. 80, no. February, pp. 73–80, 2001.
- [88] V. Aleksic et al., “Low-level Er: YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK,” *Lasers Med. Sci.*, vol. 25, no. 4, pp. 559–569, 2010, doi: 10.1007/s10103-010-0761-5.

ANEXOS

Anexo 1



CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeitos da terapia laser de baixa intensidade (LLLT) em modelo de neuropatia diabética experimental induzida em ratos Lewis", protocolo nº 3902-1, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada / Willians Fernando Vieira, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 15 de junho de 2015.

Vigência do projeto: 08/2015-12/2018

Espécie/Linhagem: Rato isogênico / Lewis

No. de animais: 432

Peso/Idade: 06 semanas / 200gr

Sexo: machos

Origem: CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 15 de junho de 2015.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima-Alonso
Secretária Executiva

Anexo 2



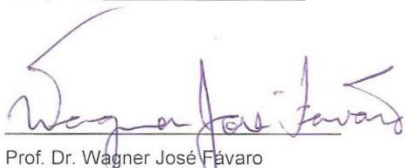
CERTIFICADO

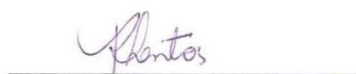
Certificamos que a proposta intitulada Estudo do efeito anti-hiperalgésico da fotobiomodulação (PBMT) na neuropatia diabética periférica induzida em ratos Lewis, registrada com o nº 5337-1/2019, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada e Willians Fernando Vieira, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 08/08/2019.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/10/2019 a 30/09/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	08/08/2019 a 30/09/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Rato isogênico / LEW/HsdUnib (Lewis)
No. de animais:	160
Idade/Peso:	6.00 Semanas / 200.00 Gramas
Sexo:	Machos
Origem:	CEMIB/Unicamp
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério LED, Área de Fisiologia e Biofísica, DBEF/IB /UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 23 de agosto de 2019.


Prof. Dr. Wagner José Favaro
Presidente


Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Anexo 3

DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Tese de Doutorado, intitulada “**Efeitos da Terapia Laser de Baixa Intensidade (LLLT) em Modelo de Neuropatia Diabética Experimental**” não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 03 de fevereiro de 2020.

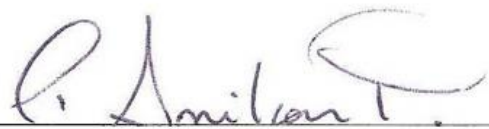


Assinatura: _____

Nome do autor: **Willians Fernando Vieira**

RG n.º 44.680.375-3

CPF n.º 369.181.498-06



Assinatura: _____

Nome do Orientador: **Carlos Amilcar Parada**

RG n.º 7962382

CPF n.º 025.116.248-69