
Universidade de São Paulo
Instituto de ciências biomédicas

Luara Caniato Araujo

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A FOTOBIMODULAÇÃO E O EXERCÍCIO
EM MEIO AQUÁTICO NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE ANIMAIS COM DOR
NEUROPÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em ciências biomédicas.

Orientadora: Profa. Dra. Marucia Chacur

São Paulo
2023

Luara Caniato Araujo

Efeito da associação entre a fotobiomodulação e o exercício em meio aquático no músculo gastrocnêmio de animais com dor neuropática

Tese apresentada no Programa de pós graduação em biologia de sistemas do Instituto de ciências biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em ciências .

Área de concentração : Biologia de Sistemas

Orientador: Profa Dra Marucia Chacur

São Paulo

2023

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Caniato Araujo, Luara
/ Luara Caniato Araujo; orientadora Marucia
Chacur. -- São Paulo, 2023.
58 p.

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

1. dor. 2. CCI. 3. fotobiomodulação. 4. exercício.
5. músculo. I. Chacur, Marucia , orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luara Caniato Araujo

Titulo da Dissertação/Tese: **Efeito da associação entre a fotobiomodulação e o exercício em meio aquático no músculo gastrocnêmio de animais com dor neuropática**

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

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

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "FOTOBIMODULAÇÃO E EXERCÍCIO AQUÁTICO NA FORÇA, FUNCIONALIDADE E NOCICEPÇÃO INDUZIDA EM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA", protocolada sob o CEUA nº 3110030221, sob a responsabilidade de **Marucia Chacur** e equipe; **Luara Caniato Araujo** - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 13/05/2021.

We certify that the proposal "Photobiomodulation and Swimming in force, functionality and Nociception induced in a Neuropathic Pain Model", utilizing 120 Heterogenics rats (120 males), protocol number CEUA 3110030221, under the responsibility of **Marucia Chacur** and team; **Luara Caniato Araujo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 05/13/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **48 meses**

Depto/Setor: **Anatomia**

Origem: **Biotério do Departamento de Anatomia**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

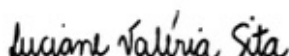
sexo: **Machos**

Idade ou peso: **200 a 250 g**

Linhagem: **Wistar**

N amostral: 120

São Paulo, 12 de julho de 2022



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Agradecimentos

Que experiência!

Essa é uma parte extremamente difícil, escrever os agradecimentos.

Sou grata pela oportunidade e por ter conseguido conquistar essa nova fase!
Mas acima de tudo, agradeço a todos que estiveram ao meu lado nessa fase, amigos, colegas de trabalho e a todos que de alguma forma fizeram a diferença (como nossos queridos funcionários do biotério e o professor Adilson)!

Aos dias corridos, choros, sorrisos, alegrias, conquistas e até o estresse gerado, devo fazer um agradecimento especial a algumas pessoas...

Gostaria de agradecer a minha orientadora, Professora Doutora Marucia Chacur, nossa
“Mãezona”

Que me acolheu, acompanhou e me ensinou tudo e muito mais do que apenas a pesquisa, companheira de dias bons e ruins, o agradecimento é pela oportunidade de ter concluído essa etapa e por ter lhe conhecido !

E é claro, não poderia deixar de agradecer a minha melhor parte .. minha família !
Aos queridos Tios, Tias e minha “Véia”, que mesmo as vezes não compreendendo 100% o que foi este trabalho se fizeram presentes e se mostraram orgulhosos mesmo assim!

E aqueles que ouviram tantas vezes minhas apresentações que chegaram até a decorar partes, ouviram minhas lamentações , meus pulos de alegria e estiveram presentes em todos os momentos...

Mamãe (Arlete Aparecida Caniato Araujo), Papai (Marco Antonio de Melo Araujo) e Teteu (Matheus Caniato Araujo)

Sem vocês nada disso seria possível!

Amo Vocês

Obrigada!

Epígrafe

**“ If you can dream it ,
You can do it ! “**

“ It all started with a mouse “

Walt Disney

Resumo

Na prática clínica, tem sido extensivamente reportado que a dor neuropática é de difícil tratamento, além de ser um importante problema de saúde pública. As opções terapêuticas para o controle da dor neuropática têm aumentado nos últimos anos, entretanto a resposta dos pacientes com esse tipo de dor, para muitos, não é satisfatória. Na última década diversos estudos têm mostrado que os tratamentos não medicamentosos como fotobiomodulação e exercício físico tem sido cada vez mais usados como adjuvantes a prática clínica. O objetivo desse trabalho é avaliar se o exercício físico, em meio aquático, associado ou não com a fotobiomodulação tem seus efeitos potencializados no modelo animal de constrição do nervo isquiático. Para isso avaliamos o impacto das terapias sobre a força e atrofia muscular, na resposta nociceptiva, na presença ou não de células inflamatórias e colágeno, ensaios de histologia para quantificar proteínas reguladores da miogênese, sendo eles PAX-7 e MYOD após as intervenções terapêuticas. Além de verificar por imagens e quantificar fatores relacionados a atrofia, no músculo gastrocnêmio. Até o momento, nossos resultados demonstraram um efeito benéfico na resposta algica e comportamento motor, além da diminuição de células inflamatórias. Demonstrando o efeito benéfico de ambas as terapias de forma individual ou mesmo em associação. Sendo de suma importância a investigação de terapias complementares para o tratamento da dor neuropática, uma vez que esta patologia não responde satisfatoriamente a nenhum tipo de intervenção convencional.

Abstract

In clinical practice, it has been widely reported that neuropathic pain is difficult to treat, in addition, neuropathic pain has been reported as an important public health issue. Therapeutic options for the management of neuropathic pain have been increased along the years, however the response of these patients is still not satisfactory. In the last several studies have shown that non-pharmacologic treatments such as photobiomodulation and swimming have been increasingly used as adjuncts to clinical practice. The aim of this work is to evaluate whether swimming associated or not with photobiomodulation has its effects potencialized on a model of chronic constriction injury. We evaluated nociceptive responses, impact of behavioral therapies on muscle strength and atrophy, as well as the determination of muscle fiber types after therapeutic interventions. We also performed histology assays to quantify myogenesis regulatory proteins, as well as atrophy-related factors and images, in the gastrocnemius muscle. Our results have demonstrated a beneficial effect on pain and motor response, when we associate both therapies. An investigation of therapeutic alternatives for the treatment of neuropathic pain is important, since this pathology does not respond satisfactorily to any type of conventional intervention.

Lista de Figuras

Figura 1 – Imagem representativa da atrofia muscular.....	18
Figura 2 – Imagem representativa da lesão constrictiva crônica no nervo isquiático de ratos	25
Figura 3 – Ilustração do modelo de injúria por constrição crônica (CCI).....	25
Figura 4 – Painel A) Imagem ilustrativa do recipiente utilizado para o treinamento aquático dos animais. Painel B) Animal realizando a adaptação ao meio aquático no ambiente determinado.....	25
Figura 5 – Painel A) Aparelho LASER Pulse Ibramed, utilizado para o procedimento da técnica de fotobiomodulação. Painel B) Aplicação da técnica de Fotobiomodulação nos animais operados e seus pontos específicos.....	28
Figura 6 – Linha do tempo representando a linha do tempo do experimento geral.....	28
Figura 7 – Linha do tempo representando a linha do tempo do experimento dos grupos exercício.....	29
Figura 8 – Linha do tempo representando a linha do tempo do experimento dos grupos fotobiomodulação.....	29
Figura 9 – Linha do tempo representando a linha do tempo do experimento dos grupos exercício e fotobiomodulação.	30
Figura 10 – Ilustração do teste de pressão de pata.....	31
Figura 11– Imagem Ilustrativa do Teste de Von Frey Eletrônico.....	32
Figura 12– Imagem ilustrativa do modelo experimental de Hiperalgisia térmica.....	32
Figura 13 – Painel A) Ilustração do teste da Alodinia ao frio utilizando acetona. Painel B) Foto tirada para mostrar a aplicação e o container utilizado.....	33
Figura 14 – Painel A, B e C Imagens ilustrativas do teste “Static Weight Bearing” ou Teste de Incapacitância em ratos.....	34
Figura 15 – Imagem representativa da técnica de Western Blotting.....	35
Figura 16 – Imagem Ilustrativa das técnicas de coloração (HE e Picro Sirius)	36
Figura 17 – Análise comportamental da hiperalgisia mecânica.....	38
Figura 18 – Análise comportamental da hiperalgisia térmica e alodinia ao frio.....	40
Figura 19 – Análise comportamental da Incapacitância.....	41
Figura 20 – Imagens ilustrativa da diferença de tamanho do músculo dos animais.....	42
Figura 21 – Gráfico de barras representando a expressão proteica do anticorpo Pax-7....	44
Figura 22 – Gráfico de barras representando a expressão proteica do anticorpo MYOD.	45

Figura 23 – Cortes transversais corados com a técnica de Hematoxilina e Eosina.....	47
Figura 24 – Gráficos representando a técnica de Hematoxilina e Eosina.....	47
Figura 25 – Cortes transversais corados com a técnica de Picro Sirius Red.....	48
Figura 26 – Gráficos representando a técnica de Picro Sirius Red.....	51

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Parâmetros utilizados para a fotobiomodulação.....	22
--	-----------

Lista de Abreviações

IASP - International Association for the Study of Pain

SNP – Sistema Nervoso periférico

SNC – Sistema Nervoso Central

CCI – Constrição crônica do nervo isquiático

MyBP-C - Proteína C de ligação à miosina

MyHC 2 – Cadeia pesada de miosina 2

CS – Células Satélite

MRFs - Fatores regulatórios miogênicos

bHLH - Fatores de transcrição hélice-alça-hélice

MRF4 – Fator Miogênico 4

Myf-5 - Fator Miogênico 5

Myf-1 - Miogenina

PAX - 7 - Fator de transcrição 7

MYOD - Proteína de determinação de mioblastos

HGF - Fator de crescimento de hepatócitos

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina

FGF - Fator de crescimento de fibroblastos

LIF - Fator inibidor da leucemia

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

FBM - Fotobiomodulação

EMR - Radiação eletromagnética

NIR – Near Infra Red (Infravermelho)

UV – Ultravioleta

SHAM - Falso operado

CCI + Exercício - Grupo tratado com exercício em meio aquático

CCI + FBM - Grupo tratado com Fotobiomodulação

CCI + Exercício + FBM - Grupo tratado com a associação das terapias

SHAM+ FBM - Controle tratado com Fotobiomodulação

SHAM+ Exercício - Controle tratado com exercício em meio aquático

SHAM+ Exercício + FBM - Controle tratado com a associação das terapias

BL – Baseline (Medida Basal)

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dor Neuropática

“Dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante àquela associada a dano real ou potencial ao tecido” [1]. Dentre os tipos de dor descritos na literatura, definidos pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (“*International Association for the Study of Pain*”; IASP), a dor neuropática foi escolhida como foco deste trabalho, sendo, portanto, definida como uma dor que ocorre como consequência direta de uma lesão ou de doenças que afetam o sistema somatossensorial. A dor neuropática é um tipo de dor crônica induzida por danos, lesão e pressão no sistema nervoso periférico (SNP) e central (SNC), é também um dos tipos de dor de mais complexo tratamento devido a sua fisiopatologia complexa[2].

A dor neuropática apresenta características desagradáveis, sendo alguns destes sintomas, queimação, dormência, formigamento, agulhada, alodinia, hiperalgesia mecânica ou térmica. Segundo a revisão sistemática da literatura realizada por Guo et al. (2019), sua ocorrência pode chegar a 10% na população geral sendo, portanto, um problema de saúde pública que acaba impactando na qualidade de vida de muitos indivíduos [3].

Com a longevidade aumentando, os casos de dor neuropática têm aumentado, muito devido ao sedentarismo, a má alimentação da população em geral que acaba em muitos, gerando um quadro de obesidade, diabetes e pré-diabetes e alguns dentre outros fatores ambientais ou mesmo a fatores genéticos. Ainda, na prática clínica tem sido extensivamente reportado que a dor neuropática possui difícil tratamento, muito devido a falta de compreensão dos mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento e manutenção dessa dor [4]. Outro fator considerado envolvido na dor neuropática refere-se à ocorrência de lesões no sistema nervoso periférico, caracterizadas por focos ectópicos de lesão nas fibras nervosas periféricas que por sua vez tem a função de manter os impulsos nervosos aferentes contínuos até o sistema nervoso central, essa alteração na sensibilização central devida à lesão de nervos periféricos também contribui para o desenvolvimento da dor neuropática [3, 5, 6].

Os nervos periféricos como por exemplo o nervo isquiático, são responsáveis pela condução de impulsos nervosos aferentes contínuos para o sistema nervoso central. Alguns modelos de constrição do nervo, como a própria constrição do nervo isquiático também contribuem para o desenvolvimento da dor neuropática [3, 6]. Na clínica, a constrição do nervo isquiático é chamada de Cialgia ou Dor ciática, que consiste no estado causado pela constrição do nervo isquiático [6] que gera dor e uma inflamação ao longo do nervo, afetando também tecidos adjacentes a ele. Além da dor característica desse quadro de cialgia, muitos pacientes

têm restrições na mobilidade [7(De Souza, 2007 #506, 8, 9)]o que naturalmente pode levar a uma redução da atividade física mesmo que diária. Em modelos animais, existem alguns protocolos que mimetizam a dor neuropática como transecção total do nervo isquiático ou lesão por esmagamento [10], ou ligação nas raízes nervosas de seus gânglios respectivos [11] e a ligação no nervo isquiático, modelo esse descrito por Bennett et al, 1988, e utilizada neste trabalho como nosso modelo de estudo[12].

Atualmente o tratamento da dor neuropática é realizado através de medicamentos antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes, administração de anestésicos locais, agentes tópicos, analgésicos opióides, antiarrítmicos e até neurocirurgias. Apesar da gama de abordagens farmacológicas, a resposta dos pacientes para esses tratamentos ainda não é satisfatória [3, 4, 13], além de ter uma diversidade de efeitos colaterais adversos, como maiores riscos de infarto, miopatias subagudas, hipergastrinemia, tumores gastrointestinais, entre outros [14].

Os tratamentos não-medicamentosos cada vez mais vem ganhando seu espaço devido a seus bons resultados, pela melhora na qualidade de vida e por não apresentarem efeitos colaterais adversos [3, 13, 15-22]. Desta forma, o entendimento da fisiopatologia da dor e de seus processos, é de uma enorme importância para a compreensão dos mecanismos que desencadeiam os processos dolorosos e, portanto, a escolha da melhor forma de tratamento para o paciente.

1.2 Tecido Muscular Estriado Esquelético

O músculo estriado esquelético é o tecido mais abundante do corpo humano, representando aproximadamente 35% a 45% da massa corporal total [23], a musculatura esquelética também é composta por numerosas fibras estriadas, cilíndricas e alongadas denominadas miócitos, que tem como função postura, produção de calor e proteção e movimento através da contração voluntária da musculatura [23-26]. Em relação à sua constituição, as fibras musculares são compostas por miofibrilas formadas por sarcômeros seriados (menor unidade contrátil do músculo)[26, 27], cuja a morfologia é delimitada por dois discos Z, composto por filamentos de actina e miosina associados com nebulina e titina, respectivamente, além de proteínas que auxiliam a estrutura e função como troponina, tropomiosina, obscurina e proteína C de ligação à miosina (MyBP-C).[26, 28].

O músculo estriado esquelético é formado por miofibras, como citado anteriormente, que são associadas aos tecidos conjuntivos (endomísio, perimísio e epimísio) e são organizadas em feixes que se prolongam por todo o músculo. Em geral são inervadas por terminações nervosas

do sistema nervoso periférico que são conectadas as miofibras. Essas conexões são essenciais para a transmissão do potencial de ação do sistema nervoso ao tecido muscular e é a partir delas que ocorre a contração muscular [29] [24, 26] .

Dado tais informações e com base na literatura, sabemos que a dor neuropática pode afetar diretamente e indiretamente o tecido muscular, de forma a modificar sua função e estrutura através da perda de massa, função e atrofia muscular [8, 26] como mostrado em modelos experimentais [12, 30] [31] [8] no entanto, as contribuições em relação a lesões nervosas e atrofia muscular permanecem incertas.

Devido a isto, o músculo adjacente a lesão nervosa pode ser afetado por essa falta de comunicação nervosa [32], podendo ter um comprometimento em sua junção neuromuscular caso ocorra denervação, tendo, portanto, uma falha de comunicação entre o nervo e o músculo [33]. Uma das capacidades mais notáveis do músculo esquelético é seu potencial adaptativo [23], de modo a ser modificado de acordo com as experiências e treinamentos de cada indivíduo. O treinamento de resistência é bem conhecido por induzir hipertrofia muscular e aumentar a força e massa muscular por conta do aumento do número de fibras musculares. Em contraste, certas doenças ou condições diferentes, como a imobilização, a baixa utilização de um músculo ou em casos mais severos como a constrição de um nervo como o nervo isquiático, envelhecimento, denervação podem levar à atrofia muscular e perda de função muscular [31, 34].

O músculo gastrocnêmio é um músculo superficial, localizado na região posterior da perna. É constituído pelos ventres medial e lateral, que possuem extremidades proximais nos côndilos femorais medial e lateral. Os ventres deste músculo formam uma aponeurose na extremidade distal que se estende ao tendão calcâneo e tem ação na flexão plantar, na marcha, na propulsão, no balanço, além de auxiliar na flexão do joelho [35] [26]. É composto por 50 % de fibras que possuem contração lenta (fibras do tipo 1, marcadas pelo anticorpo MyHC 1 da cadeia pesada de miosina) e 50% por fibras de contração rápida (fibras do tipo 2, marcadas por diferentes anticorpos da cadeia pesada de miosina 2 ou MyHC 2). E como mostrado por Zhao et al. em 2019, terapias alternativas como a eletroacupuntura podem retardar a atrofia no músculo gastrocnêmio no modelo de CCI, o que possivelmente está associado a expressão positiva de micro RNA's (Myod, Myog, Myh7), que controlam a diferenciação das células satélite e a diferenciação dos tipos de fibras musculares [36].

Neste trabalho, escolhemos como foco principal de estudo o tecido muscular estriado esquelético, mais especificamente o músculo gastrocnêmio sendo ele adjacente ao tecido nervoso lesado pela constrição do nervo isquiático, fonte da dor neuropática gerada neste estudo.

1.2.1 Atrofia

A massa muscular é suma importância para o corpo humano, além disso ela é facilmente adaptável tanto ao treinamento ou quanto ao desuso, sendo, portanto, capaz de se adaptar a diferentes condições fisiopatológicas através de vias de ativação que regulam o turnover de proteínas. A massa muscular, como a de qualquer outro tecido, depende do turnover das proteínas e das células [37]. Em termos de regeneração muscular, os principais fatores são as CS (células satélites), definidas por uma população de células miogênicas indiferenciadas localizadas entre a lâmina basal e a membrana plasmática das fibras musculares [37-39].

Embora essas células desempenhem um papel importante no crescimento muscular pós-natal, estudos recentes desafiaram a ideia de que as CS são necessárias para a manutenção da massa muscular e hipertrofia na idade adulta [37, 39]. Estas células fazem parte de uma população de células com grande atividade mitogênica, que contribuem para o desenvolvimento e crescimento muscular, reparo de fibras musculares danificadas e a manutenção do músculo esquelético adulto, isto é, cada uma com sua devida função [37, 39].

Em condição fisiológica normal, as CS do músculo adulto permanecem em repouso, um estado chamado de quiescência, quando um estímulo traumático ou lesivo ocorre, a resposta a ele começa iniciando então o processo regenerativo [38-41]. Uma vez ativadas, entram em estado de proliferação e diferenciação por meio da ativação de genes específicos e fatores específicos, como fatores regulatórios miogênicos (MRFs), que são uma família de fatores de transcrição hélice-alça-hélice (bHLH) e regulam genes músculo-específicos como desmina, troponina I e cadeia leve da miosina, sendo composto por 4 membros: Fator Miogênico D (MYOD ou Myf-), Fator Miogênico 5 (Myf-5), Miogenina (*Myf-1*) e Fator Regulatório Miogênico 4 (MRF4 ou Myf-6) [38-41]. Durante a quiescência as CS expressam o Fator de transcrição 7 (Pax7) que vem sendo cada vez mais estudado por sua relação a regeneração muscular. Após um estímulo as CS entram no ciclo celular expressando fatores de regulação miogênica. Numa fase inicial, onde ocorre o estímulo, a regulação é feita pelo Myf5, este que inicia a proliferação celular, seguida da expressão concomitante de MYOD, que é um importante marcador da maioria das novas CS ativadas (proteína de determinação de mioblastos), após o processo de proliferação e diferenciação celular dará origem a novos mioblastos [38-40]. O processo de regeneração muscular é um processo de alta complexidade, necessário para recuperar a forma e função do tecido muscular, são regulados através de fatores de crescimento, e qualquer disfunção desse processo pode desencadear na falta dessa regeneração ou até degradação de miofibras, aumento no processo inflamatório e aumento da produção do tecido conjuntivo intra muscular (fibrose)[42, 43].

Em casos como imobilização, envelhecimento, desuso ou falta de ativação muscular e em situações patológicas como neuropatias /diabetes e constrições do nervo pode ocorrer o processo de atrofia, este definido pela a diminuição no tamanho de um tecido ou órgão devido ao encolhimento celular (Figura 1); diminuição no tamanho das células, causada pela perda de organelas, citoplasma e proteínas[34, 41, 44].

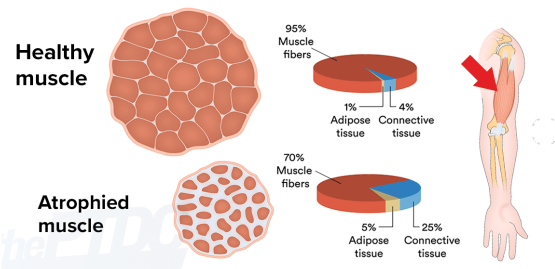


Figura 1: Imagem representativa da atrofia Muscular adaptada de Carroll[45]

O músculo atrofiado apresenta um aumento na concentração de tecido conjuntivo e tecido adiposo intramuscular[46], além da degradação de proteína com ou sem síntese de proteína diminuída, o que sugere um desequilíbrio na síntese e degradação de proteína, além de ser uma das principais causas para perda de massa muscular. A atrofia muscular tem um efeito diverso e profundo na saúde geral, porque a musculatura tem funções extremamente importantes no corpo humano e não só contribui para a estrutura, sustentação e a movimentação do corpo, como também para o armazenamento e suprimento de proteína e nutrientes [47, 48].

Um dos principais e mais estudados sistemas moleculares para a degradação de proteínas é o sistema ubiquitina-proteassoma [47, 49, 50], esse sistema apresenta altos níveis de conjugação de ubiquitina e regulação positiva de genes relacionados à ubiquitina-proteassoma, no músculo atrofiado esses marcadores foram evidentes, duas proteínas específicas dessa via e do músculo são os principais fatores correlacionados responsáveis pela ubiquitinação, a Atrogina-1 e MuRF-1[47, 51]. Falando sobre esses marcadores a Atrogina 1 ou F-box 32 é uma proteína que é codificada pelo gene FBXO32, relacionada a atrofia muscular e atinge especificamente a MYOD, esta por sua vez atinge genes específicos que são importantes para a diferenciação muscular. Portanto a atrogina 1 induz a atrofia muscular inibindo o processo de hipertrofia (crescimento muscular) [47], já o MuRF-1 ubiquitina as cadeias de miosina do músculo, portanto ele tem a função de promover a atrofia depredando componentes musculares específicos [47], sendo em sua maior parte as fibras do tipo 1 geralmente de maior predominância no corpo humano, são as mais afetadas pela atrofia muscular [37, 47, 52].

Já é comprovado em alguns estudos que a dor neuropática contribui para a atrofia e para a diminuição de ativação muscular, muitas vezes devido a falta de uso do membro lesado, o que gera um aumento na degradação de proteínas, uma diminuição da síntese proteica, ou ambos [8]. Ainda não se sabe ao certo o efeito de tratamentos não medicamentosos, como o exercício em meio aquático e a fotobiomodulação nas complicações induzidas pelo modelo de dor neuropático como o escolhido nesse projeto.

1.3 Exercício físico e Exercício aquático

O exercício físico recruta muitos músculos do corpo humano, por consequência aumenta a atividade muscular pelo aumento da síntese proteica devido a alta demanda muscular. O tratamento por exercícios aplicado com o objetivo de diminuir a dor neuropática e reduzir os efeitos causados pela atrofia muscular devido a constrição do nervo tem sido demonstrada em estudos e vem sendo cada vez mais estudadas [53, 54].

Pensando em um modelo mais efetivo e menos agressivo e mais adequado ao tipo de lesão dos nossos animais, escolhemos o exercício em meio aquático como tratamento para este estudo pois a água induz um menor impacto nos animais, sendo, portanto, menos doloroso o tratamento [55]. Alguns estudos apresentaram que o treinamento de natação por quatro semanas atenuou o progresso da hiperalgesia térmica bem como alodinia em ratos com dor neuropática, além demonstrarem uma maior expressão de Hsp72 e níveis menores de TNF- α ou IL-1 β na medula espinal em comparação ao grupo lesado [56, 57]. A partir destes estudos podemos ver que a natação pode ser um tratamento eficaz para dores do tipo neuropática, pois além de diminuir o comportamento da dor e, é uma terapia econômica e segura que tem sido cada vez mais estudada para o entendimento de seus mecanismos [57, 58]. Em relação ao tecido muscular, os efeitos benéficos encontrados do exercício são bem conhecidos como, por exemplo, melhora na circulação, aumento de massa muscular, aumento da produção e liberação de endorfinas, levando à melhora na depressão, ansiedade e cognição e em neuropatias como o CCI [59-62]. O tecido muscular esquelético é um tecido que possui uma grande ligação com o tecido endócrino, este por sua vez quando ativo, libera miocinas que podem ser parte responsáveis pelo efeito benéfico do exercício, como por exemplo, o HGF (fator de crescimento de hepatócitos), IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina), FGF (fator de crescimento de fibroblastos), LIF (fator inibidor da leucemia), as interleucinas IL-4, IL-6 e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). A IL-4 em particular induz a ativação de macrófagos do fenótipo M2, que contribuem para o alívio da dor por meio da produção de citocinas anti-inflamatórias. Além disso, no músculo, os níveis de IL-4 aumentam durante o exercício físico,

o que pode levar a um aumento ainda maior de citocinas anti-inflamatórias em nervos periféricos lesados [2], além de estimular a musculatura afetada pelo CCI [8].

Vários estudos experimentais foram publicados e mostram os efeitos benéficos, do exercício físico na dor neuropática [15, 53, 63] [54]. Esses estudos mostram que em modelos de lesão incompleta da medula espinal, os animais que passaram por atividade física, tiveram uma implementação precoce no processo de recuperação motora [53]. Ainda em relação a função motora, o estudo de Bertolini, 2011 mostrou no modelo de CCI que animais exercitados com natação progressiva tiveram um aumento no limiar nociceptivo no teste de Incapacitância[54]. Ainda, estudos realizados pelo grupo de Detloff, demonstraram melhora do quadro algico, em animais com neuropatia periférica [64, 65].

Resultados similares foram apresentados por Nees et la., em 2016, onde demonstraram que o exercício modula calcitonina e melhorar a função motora dos animais (Teste de campo aberto), além de aumentar os limiares nociceptivos na hiperalgesia mecânica (Von Frey), hiperalgesia térmica (Hargreaves e alodinia ao frio (Teste de placa fria) [66].

Conforme evidenciado nos estudos mencionados anteriormente, a prática de exercícios físicos demonstra uma variedade de efeitos benéficos no que diz respeito à gestão da dor e ao fortalecimento muscular, além disso pode contribuir com a melhora da qualidade de vida do paciente, pelo próprio exercício[67] assim como em possíveis sintomas depressivos [68] que são extremamente comuns no paciente com dor neuropática. A melhora na qualidade de vida do paciente já pode trazer uma melhora do quadro e conseqüentemente uma maior adesão ao tratamento.

Se pudéssemos potencializar os efeitos dessa abordagem terapêutica ou adotar uma terapia complementar concomitante para aprimorar os resultados obtidos pelo exercício, seria plausível conjecturar a possibilidade de redução ou mesmo reversão da dor e da lesão muscular.

1.4 Fotobiomodulação (FBM)

A fim de complementar os efeitos do exercício, utilizamos nesse estudo a terapia de Fotobiomodulação (FBM). Essa vem sendo cada vez mais estudada e vem demonstrando efeitos benéficos tanto para dores crônicas como para agudas. Além de ser benéfico em outras patologias como no tratamento de alguns tipos de câncer [69-71], estomatite [72], diabetes [22], tratamentos ortodônticos e hipersensibilidade dentária [73, 74], lombalgia [75], dor pós-cirúrgica [76] e dor crônica relacionada a osteoartrite, cefaléia [77], dor lombar [78], síndrome do túnel do carpo, disfunção temporomandibular [79], dor muscular [80] e em modelos de lesão do nervo isquiático [81, 82].

Fotobiomodulação é a resposta metabólica e citológica de células vivas aos fótons, ou seja, energia de luz, compreendendo radiação eletromagnética (EMR) no espectro visível e em porções das bandas infravermelho próximo (NIR) e ultravioleta (UV). Uma concatenação de "foto" que significa luz, "bio" que significa "células vivas" e "modulação", o termo fotobiomodulação descreve reações bioquímicas que ocorrem em células vivas em resposta à luz. Alguns estudos apresentam resultados positivos em relação ao tratamento com esta terapia, como por exemplo a revisão sistemática de Ibarra et al (2020) que mostra que a neurogênese estimulada pela FBM leva a ativação de neuroproteção por meio da oxigenação das células [83]. Pigatto et al. (2020) observou no modelo de lesão nervosa espinal que a aplicação de um LED infravermelho foi capaz de reduzir a hipersensibilidade mecânica e a alodinia ao frio [82]. Ainda, um estudo sobre a lesão no nervo periférico estabeleceu que a FBM seria efetiva pois foi possível observar uma ativação microglial na medula espinal e aumento na ativação de macrófagos anti-inflamatórios no gânglio da raiz dorsal dos animais tratados com FBM [84].

A terapia de fotobiomodulação além de apresentar diversos benefícios descritos pela literatura (como citado acima), é de fácil aplicação, indolor, possui baixo custo e não tem contraindicações descritas na literatura, sendo portanto uma terapia eficaz e que completa o exercício físico em nosso trabalho.

1.5 Associação entre o exercício em meio aquático e a fotobiomodulação

Como mencionado anteriormente, existem diferentes estudos que demonstram os efeitos benéficos da terapia de fotobiomodulação e da atividade física em meio aquático. Estudos sobre terapias não medicamentosas vem crescendo nos últimos anos, a associação entre elas também é um ponto que vem sendo estudado, contudo não foram encontrados estudos mostrando o efeito da associação dessas terapias no modelo de constrição do nervo isquiático.

As associações de abordagens terapêuticas diferentes podem oferecer benefícios diferentes, no estudo de Beasi, 2021 foi mostrado que a associação das terapias de fotobiomodulação e exercício aquático no modelo de criolesão agudo, aumentou a expressão de genes relacionados a regeneração muscular [43]. Ainda, estudos utilizando FBM e exercício aquático, em modelo de osteoartrite, demonstrou ser eficaz na prevenção da degeneração da cartilagem e efeitos anti-inflamatórios [85]. Em relação a lesões musculares, foi analisado por Beasi et al. em 2020, que a própria lesão estimula fatores reguladores da miogênese (MYOD, Miogenina e TGF- β) e ambas as terapias isoladas também estimulam esses fatores, no entanto quando combinadas apresentam um aumento na expressão desses genes, principalmente em tratamentos a longo prazo[86]. Amadio et al., 2015, mostrou que a associação entre o exercício

aquático e a fotobiomodulação fornecem uma abordagem terapêutica para a redução de marcadores inflamatórios (IL-6, TNF α), quando apenas a fotobiomodulação não é capaz de melhorar o desempenho de animais idosos [87]. Ainda em animais idosos, Guaraldo et al. em 2016, apresentou que o conjunto dessas terapias pode reduzir o estresse oxidativo, além de aumentar a velocidade e o desempenho destes animais [88]. Já em relação ao perfil lipídico do animal, foi mostrado por Aquino et al. 2013, a união dessas terapias demonstrou aumentar os efeitos em relação as terapias isoladas, além da fotobiomodulação ser uma adição valiosa para redução de peso e controle dislipidêmico, quando associada a exercícios e dieta [89, 90] e em 2015, o mesmo grupo demonstrou que a associação das terapias poderia aumentar a atividade da enzima citrato sintase e diminuir a área de adipócitos brancos epididimal, retroperitoneal e visceral em ratos obesos, potencializando o efeito do exercício [89, 90].

Através de diferentes e novos estudos, podemos sugerir que a associação da terapia de fotobiomodulação e exercício em meio aquático podem apresentar efeitos potencializados.

2. JUSTIFICATIVA, HIPÓTESE E OBJETIVOS

Alternativas terapêuticas para o tratamento da dor neuropática se fazem necessárias, uma vez que essa modalidade de dor não responde satisfatoriamente aos tipos de intervenção convencionais, ou seja, cirúrgica e medicamentosa. O presente estudo torna-se importante devido à escassez de estudos demonstrando os efeitos da FBM e do exercício em meio aquático em modelo de CCI. Ambas as técnicas têm se mostrado eficaz na melhora do quadro doloroso, porém existem poucos estudos detalhando e estudando exclusivamente, o sistema muscular destes animais. A nossa hipótese de trabalho é que, possivelmente, os animais com dor neuropática tratados com ambas as terapias, ou mesmo individualmente, apresentem melhora nos comportamentos dolorosos, bem como uma melhora no quadro de atrofia muscular, função contrátil e motora, além de uma possível ação nos fatores envolvidos na manutenção e autorrenovação muscular. Assim, acreditamos que podemos contribuir de forma efetiva para os tratamentos clínicos empregados neste tipo de dor decorrente de lesões como, por exemplo, compressão de nervos e síndrome do túnel do carpo, entre outras síndromes compressivas, utilizando técnicas não-invasivas, não-medicamentosas e de baixo custo para os pacientes.

2.1. Objetivos Específicos:

- Avaliar a resposta nociceptiva induzido pela lesão de constrição do nervo isquiático, por meio do teste de hiperalgesia mecânica, hiperalgesia térmica e alodínia ao frio, antes e em diferentes tempos após tratamentos;

-
- Avaliar a função motora utilizando teste de incapacitância antes e após diferentes períodos de tratamento;
 - Analisar a expressão de proteínas como MYOD e PAX-7 no músculo gastrocnêmico após intervenções terapêuticas.
 - Analisar o músculo gastrocnêmio e possíveis comprometimentos morfológicos através do uso da técnica de Hematoxilina e Eosina após ambos os tratamentos;
 - Analisar ainda, no mesmo músculo, uma possível alteração no tecido conjuntivo dos animais após o tratamento com ambas as técnicas através do uso de Picro Sirius.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais:

Foram utilizados ratos Wistar, machos, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas, mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo da Comissão de Ética em Experimentação Animal (n: 3110030221 - CEUA) do ICB. Para a realização dos experimentos comportamentais, exercício em meio aquático e tratamentos de fotobiomodulação utilizamos a sala de comportamento do biotério do departamento de Anatomia, a qual possui isolamento acústico e temperatura controlada ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$), local em que os animais eram instalados por um período de 45 minutos para adaptação e posteriormente submetidos aos experimentos comportamentais ou ao exercício ou a fotobiomodulação. Todos os animais foram manipulados considerando os princípios e o guia de uso de animais de laboratório envolvendo dor e nocicepção[91]. Ainda, seguimos as recomendações do Comitê de pesquisa e problemas éticos (*Committee for Research and Ethical Issues da International Association for the Study of Pain*) sobre o uso de animais de laboratório, bem como o *ARRIVE guidelines*. Os animais foram expostos a um ciclo de 12h dia/12h noite, dieta padrão divididos em grupos (de 5 a 8 animais) sendo:

- Grupo 1 – SHAM (Falso operado)
- Grupo 2 – Constrição Crônica do Nervo Isquiático (CCI)
- Grupo 3 - CCI + Exercício (Grupo tratado com exercício em meio aquático)
- Grupo 4 - CCI + FBM (Grupo tratado com Fotobiomodulação)
- Grupo 5 - CCI + Exercício + FBM (Grupo tratado com a associação das terapias)
- Grupo 6- SHAM+ FBM (Controle tratado com Fotobiomodulação)
- Grupo 7- SHAM+ Exercício (Controle tratado com exercício em meio aquático)
- Grupo 8- SHAM+ Exercício + FBM (Controle tratado com a associação das terapias)

3.2. Constrição do Nervo Isquiático:

Para indução do modelo de dor neuropática, foi utilizado o método descrito por Bennett e Xie (1988). Inicialmente, todos materiais e superfícies foram devidamente higienizados e esterilizados. Os animais foram anestesiados em uma câmara de indução usando uma solução de 5% de Isoflurano com fluxo contínuo de oxigênio (5 L/ min) até que estivessem completamente adormecidos e sem reflexos aos estímulos dolorosos, seguido de uma mudança da anestesia para manutenção, de 2% de Isoflurano em fluxo contínuo de 4L/min de oxigênio de forma que permaneça desacordado e sem dor durante todo o procedimento. Foi realizada a tricotomia do pelo dos animais na área específica da cirurgia (região intermédia da coxa), esterilizada com álcool isopropílico 70% além de uma solução de iodo. Para o início da cirurgia o animal foi posicionado em decúbito ventral, com o fêmur a 90 ° da coluna, onde foi feita uma incisão paralela a 3-4mm do fêmur, a pele do músculo ao redor da incisão foi liberada de forma que fosse possível divulsionar o tecido conjuntivo que está localizado entre o bíceps femoral e o glúteo superficial. Quando encontrado o nervo isquiático (proximal à trifurcação ciática) foi exposto em aproximadamente 10 mm do tecido conjuntivo circundante, onde foram realizadas 4 amarraduras frouxas com os fios de cobre previamente esterilizados (fio categut cromado 4-0), tendo aproximadamente 1mm entre si (Figuras 2 e 3), feitas as 4 amarraduras, as pontas foram cortadas e o animal suturado. A constrição do nervo realizada foi mínima, a fim de evitar a interrupção do fluxo sanguíneo epineural. O aperto excessivo das ligaduras pode levar a axotomia e autotomia que são efeitos colaterais indesejados e impedem os testes de hipersensibilidade à dor. Cabe mencionar, que menos que 1% dos nossos animais apresentaram esse tipo de efeito colateral, e quando foi observado, o referido animal foi sacrificado e retirado do grupo experimental. O grupo controle foi composto por animais falso operados [92], submetidos à mesma incisão que os animais operados, com a exposição do nervo isquiático, porém sem a amarradura ao redor do nervo [12].

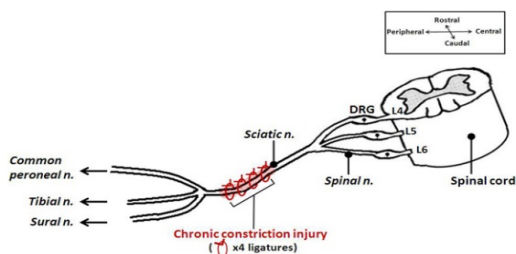
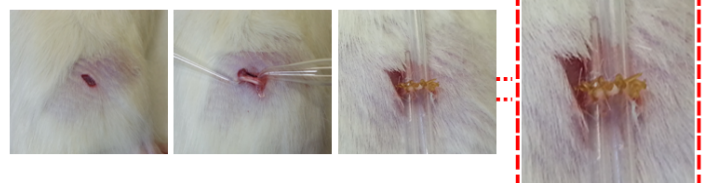


Figura 3: Ilustração do modelo de injúria por constrição crônica (CCI)- cedida pela aluna do nosso grupo Dra Mara de Oliveira.

Figura 2: Imagem representativa da lesão constrictiva crônica no nervo isquiático (CCI) de ratos: adaptado de Austin et al., 2012 [93]



3.3. Exercício em meio aquático:

O protocolo seguido foi baseado no modelo descrito por Farzad et al (2018)[56]. Os grupos que realizaram exercício físico em meio aquático passaram por 4 semanas de exercício, sendo a primeira delas como adaptação ao meio. Foram utilizados recipientes com água para mimetizar o ambiente aquático (medida do recipiente: 50 cm de diâmetro e 65 cm de profundidade, com a água a uma temperatura entre 34° e 37°) conforme imagens a seguir (Figura 4 A e 4 B).

A)



B)



Figura 4: Painel A) Imagem ilustrativa do recipiente utilizado para o treinamento aquático dos animais. Painel B) Animal realizando a adaptação ao meio aquático no ambiente determinado.

Na primeira semana os animais realizaram a adaptação ao meio aquático, tendo contato com a água em dias intercalados, ou seja, dias 2, 4 e 6. No primeiro dia de adaptação os animais realizaram uma sessão de 10 minutos de exercício, e nos dias 4 e 6, os animais tiveram um aumento na quantidade de séries e, portanto, um contato maior com o meio, sendo 2 séries de 10 minutos tendo 5 minutos de descanso entre cada série, totalizando 20 minutos de exercício.

Após a semana de adaptação os animais foram submetidos a cirurgia de CCI/SHAM. O protocolo de exercício iniciou-se no 14^o dia pós-cirurgia. A escolha do tempo se dá ao fato de trabalhos demonstrarem que a partir do 14^o dia pós-cirurgia, a neuropatia já está instalada. [12, 21]. Após os 14 dias, os animais foram submetidos ao exercício em meio aquático durante 5 dias consecutivos e dois de descanso, durante 3 semanas. No primeiro dia, da primeira semana de exercício, foram realizadas 3 sessões de 10 minutos cada, com 5 minutos de descanso entre as sessões, totalizando 30 minutos de exercício. No dia 2 os animais passam a realizar 2 sessões de 15 minutos com intervalo de 5 minutos entre as sessões, totalizando 30 minutos de exercício. Nos dias 3 e 4 foram realizadas 3 sessões de 15 minutos com 5 minutos de intervalo entre as sessões, totalizando 45 minutos de exercício; no dia 5, os animais passaram a realizar 4 sessões de 15 minutos com 5 minutos de intervalo entre as sessões, totalizando 60 minutos de exercício.

Na segunda semana, o protocolo se inicia com 4 sessões de 15 minutos com 5 minutos de intervalo entre as sessões, totalizando 60 minutos de exercício; seguido de uma redução de

séries e aumento do tempo, para 3 sessões de 20 minutos com 5 minutos de intervalo entre as sessões, totalizando 60 minutos de exercício nos dias 2 e 3 da segunda semana e para 2 sessões de 30 minutos com 5 minutos de intervalo entre as sessões, totalizando 60 minutos de exercício nos dias 4 e 5 da segunda semana. Na terceira semana os animais tiveram que realizar como treino 2 sessões de 30 minutos com 5 minutos de intervalo entre as sessões, totalizando 60 minutos de exercício durante os 5 dias de treino de sua semana. Após a terceira semana de treino, os animais foram eutanasiados e tecidos coletados. Cabe mencionar que o detalhamento dos diferentes ensaios comportamentais está descrito a seguir.

3.4. Tratamento com Fotobiomodulação - FBM:

Os animais dos grupos correspondentes ao tratamento de Fotobiomodulação seguiram um protocolo já padronizado e publicado pelo nosso grupo [21]. Cada sessão de Fotobiomodulação incluiu a estimulação de nove pontos com duração de 18 s cada ponto, com um Laser GaAs (Arsenieto de Gálio, Laserpulse- Laser, IBRAMED, Brasil- Figura 5) que emite um comprimento de onda de 904 nm com uma densidade de potência 30 mW [20]. Cada ponto realizado nesse processo possuía uma área de 0,1 cm², sendo um total de 5,4J de energia aplicada por sessão (vide Tabela 1). O tratamento com Fotobiomodulação foi iniciado no mesmo dia que o exercício aquático, ou seja, no 14^o dia pós-lesão, e foi aplicada três vezes por semana em dias alternados, durante 3 semanas.

Marca e Tipo de Emissor	Ibramed GaAs
Comprimento de Onda (nm)	904 nm Pulsado
Frequência (Hz)	9500 Hz
Densidade	30 mW
Duração do Pulso	60 ns
Tamanho do feixe no ponto alvo (cm ²)	0,1 cm ²
Tempo de Irradiação por ponto (s)	18 s
Radiante de exposição (J/cm ²)	6 J/cm ²
Radiante de Energia (J)	6 J
Número de pontos Irrradiados	9
Área Irradiada (cm ²)	0,9 cm ²
Técnica de Aplicação	Em contato com a pele
Número e Frequência de Sessões	9 sessões, 3 sessões por semana
Radiante de Energia Total (J)	5,4 J por sessão; 48,6 J no total

Tabela 1: Parâmetros utilizados para a fotobiomodulação.



Figura 5: Painel A) Aparelho LASER Pulse Ibramed, utilizado para o procedimento da técnica de fotobiomodulação. Painel B) Aplicação da técnica de Fotobiomodulação nos animais operados e seus pontos específicos.

3.5. Delineamento Experimental:

Para demonstrar nossos procedimentos, apresentamos uma linha do tempo nas Figuras 6, 7, 8 e 9. Os animais do grupo 1 [92] utilizado como controle e grupo 2 (CCI) passaram pelo mesmo protocolo experimental, no entanto sem aplicação das terapias de tratamento. Na Figura 6, apresenta-se a linha do tempo geral, o que é válido para todos os grupos. A seguir, representamos também, cada linha do tempo, em detalhes, para cada tipo de protocolo experimental. Na Figura 7, representada em azul, temos o protocolo com exercício em meio aquático e passam pelo processo de adaptação pré cirúrgico e o tratamento pós cronificação da constrição do nervo. Na figura 8, representada em Rosa, o grupo tratado apenas com Fotobiomodulação, não realizam a adaptação ao meio aquático e, portanto, tem repouso até a data da cirurgia, contando com apenas as medidas de comportamento anteriores a ela. Por fim, o grupo que recebeu tratamento associado, exercício e fotobiomodulação, representado em lilás (Figura 9).

Brevemente, após os animais chegarem no biotério, os mesmos passaram pela primeira semana de adaptação ao ambiente onde serão desenvolvidos todos os ensaios comportamentais. A seguir, foi realizada a medida basal (BL) em todos os grupos a fim de se obter o limiar basal sem nenhum procedimento, e, iniciamos o protocolo de adaptação ao meio aquático. Após o período de adaptação ao meio aquático, reavaliamos os animais (Pós- habituação-MI). No dia seguinte (dia 1), foi realizado a cirurgia (CCI ou SHAM), e 15 dias pós cirúrgico foi realizado medidas comportamentais (M1) e iniciados os protocolos experimentais de PBM ou exercício ao meio aquático conforme já descrito anteriormente. Após cada semana dos tratamentos, ou na forma individual ou na forma associada, realizamos os ensaios comportamentais (Hiperalgisia mecânica- Randall e Von Frey), hiperalgisia térmica, mensuração da resposta ao estímulo ao frio, e teste de incapacitância), portanto teremos 3 time-point (M1, M2 e M3) para cada ensaio comportamental representado nas imagens abaixo. 24horas após o término de todas

as semanas de tratamento (Dia 37), os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados para futura análise. Cabe mencionar, que as análises comportamentais, histológicas e proteicas foram realizadas em todos os 8 grupos citados acima.

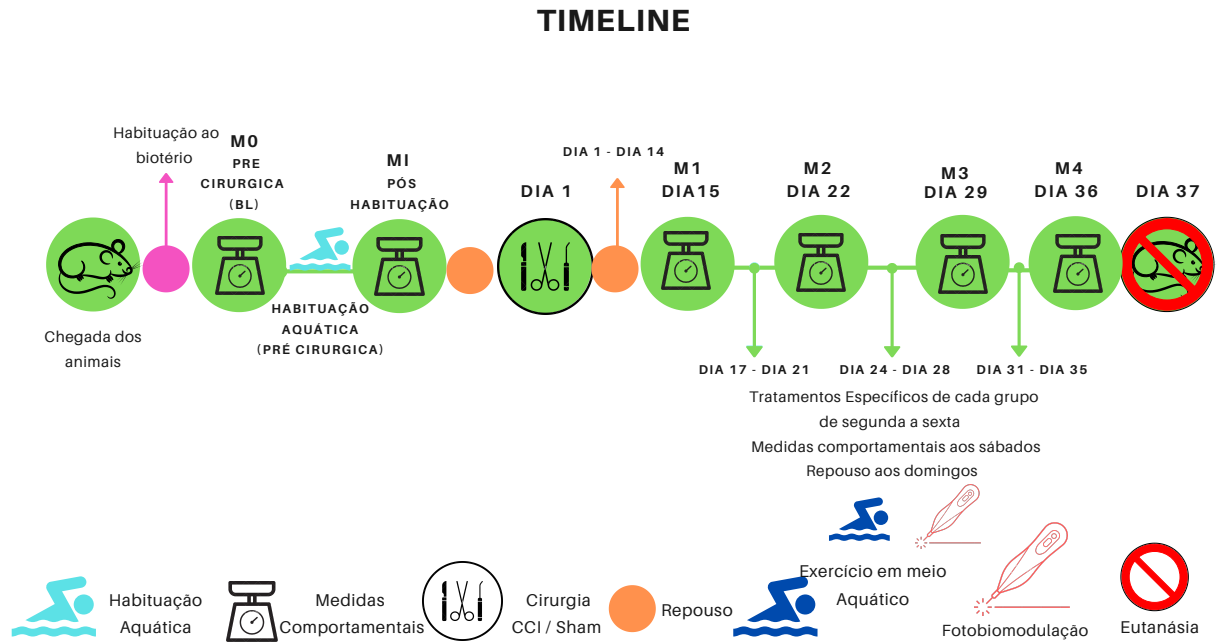


Figura 6: Linha do tempo representando a linha do tempo do experimento geral.



Figura 7: Linha do tempo representando a linha do tempo do experimento dos grupos exercício em meio aquático.

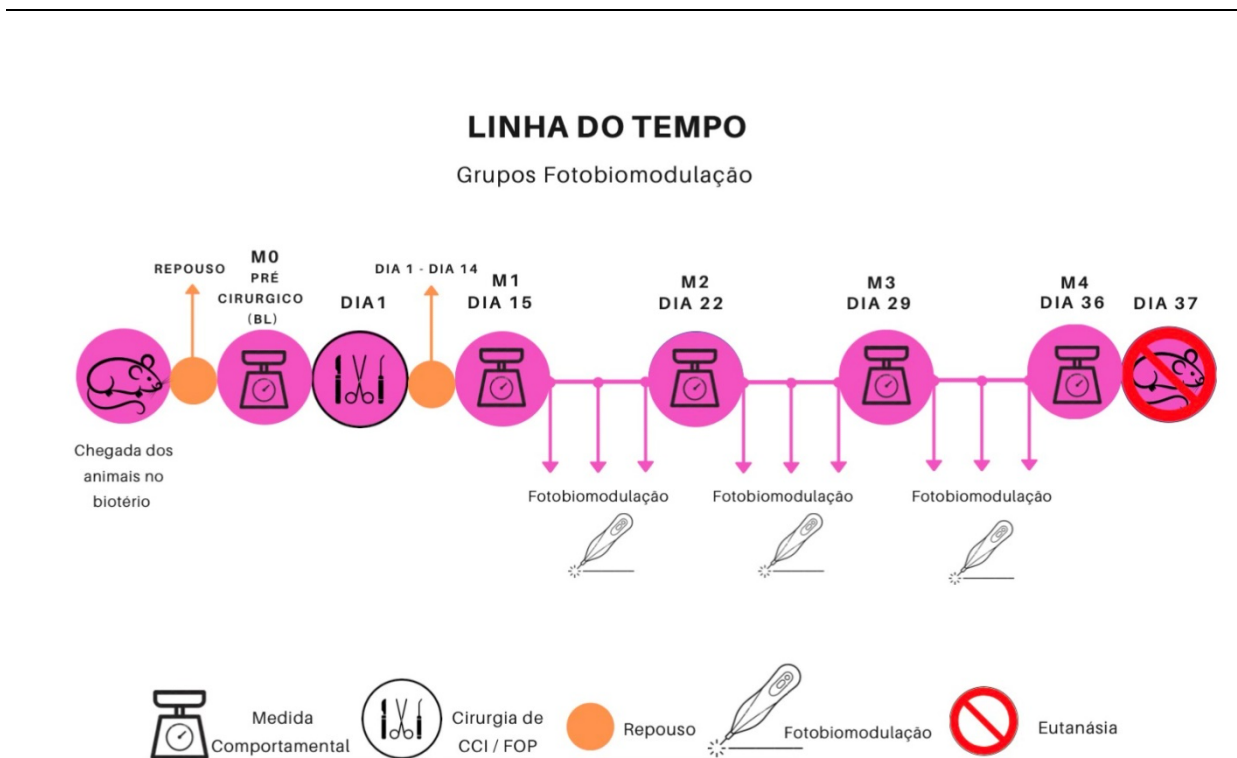


Figura 8: Linha do tempo representando a linha do tempo do experimento dos grupos fotobiomodulação.

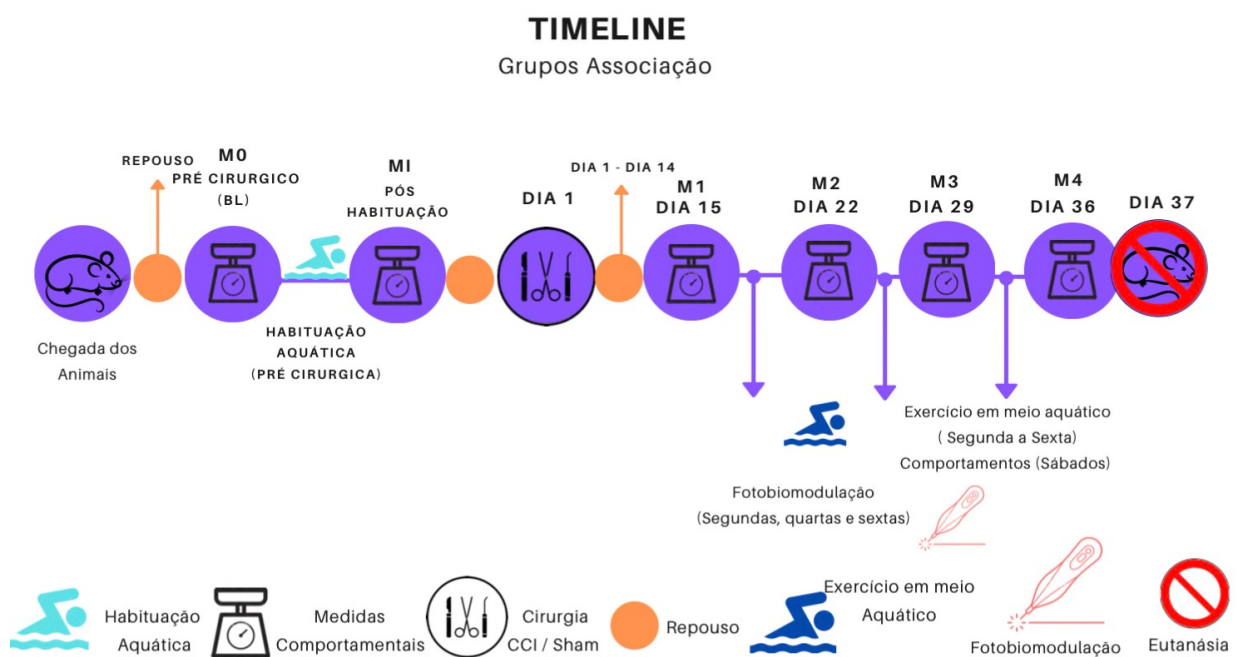


Figura 9: Linha do tempo representando a linha do tempo do experimento dos grupos exercício em meio aquático e fotobiomodulação.

3.6. Ensaio comportamentais:

Cabe mencionar, que os tempos de avaliação dos diferentes testes experimentais foram os mesmos e estão descritos a seguir: os testes foram aplicados antes do início dos tratamentos (**M0** - Medida na chegada dos animais; **MI** - medida inicial, pós Adaptação), e em diversos tempos após a indução da neuropatia (**M1**- Medida pós cirúrgicas ou 15 dias após CCI/SHAM; **M2** -Medida após primeira semana de tratamentos ou 22 dias pós CCI/SHAM; **M3** - Medida após segunda semana de tratamentos ou 29 dias pós CCI/SHAM; **M4** - Medida após terceira semana de tratamentos ou 36 dias pós CCI/SHAM). A seguir descrevemos em detalhes cada ensaio comportamental.

3.6.1. Determinação da hiperalgesia mecânica

Para a avaliação da sensibilidade dolorosa dos animais utilizamos o teste de pressão da pata de ratos (Analgesy-Meter Ugo Basile®, Itália), realizado de acordo com o método descrito por Randall e Sellito (1957) [94]. Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16 g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso da pata posterior operada do rato e interrompida quando o animal apresenta a reação de "retirada" do membro (Figura 10). Neste modelo, o limiar de dor é representado como a força (g) necessária para a indução da reação.



Figura 10 - Ilustração do teste de pressão de pata

3.6.2. Hiperalgesia Mecânica (Von Frey Eletrônico)

Para determinação da hiperalgesia mecânica foi utilizado o teste de von Frey eletrônico, utilizando-se de um analgésímetro digital (Insight ®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), segundo método descrito por Guerrero et al. (2006) (Tena et al., 2012)[95], com suas devidas adaptações ao nosso trabalho (Figura 11). O analgésímetro é composto de um transdutor de pressão, onde encontra-se acoplada uma ponteira universal do equipamento, este que é ligado por um cabo a um detector digital de força. A ponteira do transdutor é pressionada contra a superfície plantar da pata direita dos animais (Pata Ipsilateral, onde foi realizada a cirurgia de SHAM ou CCI). A pressão aplicada é expressa em gramas (g) e representa a força necessária para gerar um reflexo de retirada do membro.

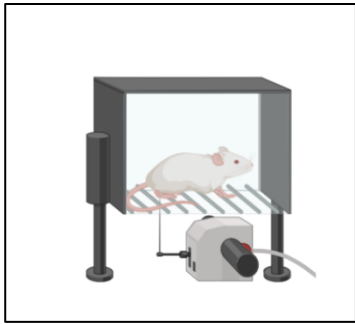


Figura 11 - Ilustração do teste de Von Frey Eletrônico.

3.6.3. Teste de Hiperalgisia Térmica (Hargreaves)

A determinação da hiperalgisia térmica foi feita por meio do teste plantar descrito por Hargreaves [96], conforme ilustrado na Figura 12. O teste consiste em aquecimento por meio de fonte de luz infravermelha aplicada na região plantar da pata posterior do rato, até que o animal apresente o comportamento de retirada da pata ou o aquecimento da pata atinja o limite de tempo predeterminado (tempo de corte de 30 segundos – para que não “queime” a pata do animal caso ele não a retire). Os animais foram colocados em compartimentos de acrílico individual com tampa com pequenos orifícios para ventilação e posicionados sobre uma plataforma de vidro especial, que permite a passagem de forma homogênea da luz e do calor. Uma fonte de luz infravermelha está acoplada a um monitor digital (Figura 12). A fonte de luz é colocada embaixo do vidro, sendo posicionada e acionada sob a pata traseira do animal. Quando a fonte de luz é posicionada e acionada pelo pesquisador, um cronômetro digital é deflagrado no monitor que fica acoplado a fonte luminosa, até que o animal retire a pata, quando, então, a fonte de luz cessa e o cronômetro para automaticamente. Caso o animal não apresente o comportamento de retirada da pata em 30 segundos, automaticamente a fonte de luz é cortada para a preservação da integridade física do animal. Os resultados foram avaliados por meio de comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

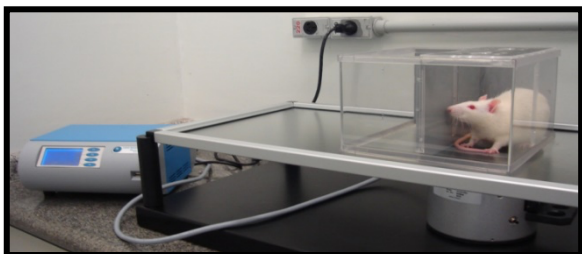


Figura 12: Imagem ilustrativa do modelo experimental de Hiperalgisia térmica.

3.6.4. Teste de Alodínia ao frio

Os animais foram aclimatados por 1 hora dentro de uma caixa de acrílico sob uma estante elevada, de malha de aço inoxidável, com espaçamento de um quarto de polegada entre

a malha (Figura 13). A alodinia ao frio foi medida com a utilização da acetona como descrito por Choi et al. (1994) e Silva et al. (2019) Hong Xing (2007) e Choi em 1994[97, 98]. Com o auxílio de uma seringa, 50 uL de acetona foi aplicado sobre a parte central da superfície plantar da pata posterior conforme imagem (Figura 13), a seguir, foi avaliado o comportamento do animal durante o tempo de 30 segundos pós aplicação da acetona. Reações como lamber, morder, cheirar ou bater a pata, foram contabilizadas e acrescentadas mais 30 s de observação caso o animal tivesse reação. A soma total das reações foi dada como o resultado em segundos da reação total e avaliada comparando antes e após as sessões de tratamento.

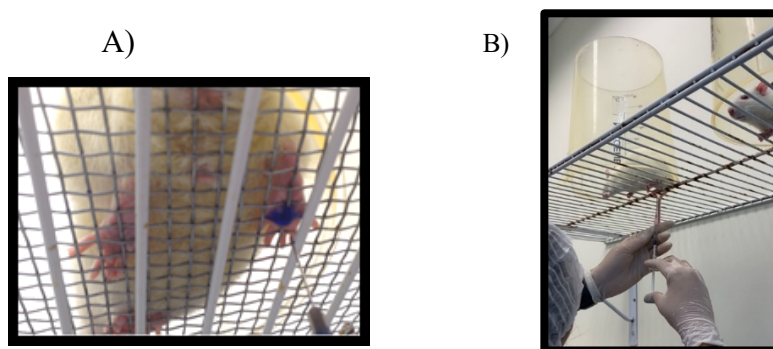


Figura 13– Painel A) Ilustração do teste da Alodinia ao frio utilizando acetona – a cor azul foi usada apenas para facilitar a observação do local aplicado. Painel B) Foto tirada para mostrar a aplicação e o container utilizado.

3.6.5. Teste de Incapacitância: “Static Weight Bearing”

Durante o experimento, os animais foram colocados, individualmente, em um suporte onde suas patas traseiras se mantinham sob duas placas contendo sensores separados como mostrado na Figura 14 conforme protocolo do aparelho [99, 100]. Os animais se instalavam no ambiente e realizavam uma adaptação de 5 a 10 minutos antes do início do teste. A força exercida por cada membro posterior (medida em gramas) é calculada em média ao longo de um período de 5s. Cada ponto de dados é a média de três leituras. O valor espontâneo do peso aplicado em cada sensor é mostrado na tela da unidade de controle. A mudança na distribuição do peso dos membros posteriores é calculada pela diferença na quantidade de peso (g) entre os membros. Os resultados foram apresentados como a diferença na sustentação de peso entre o membro direito (ipsilateral-lesionado) e o membro esquerdo (controle-contralateral).

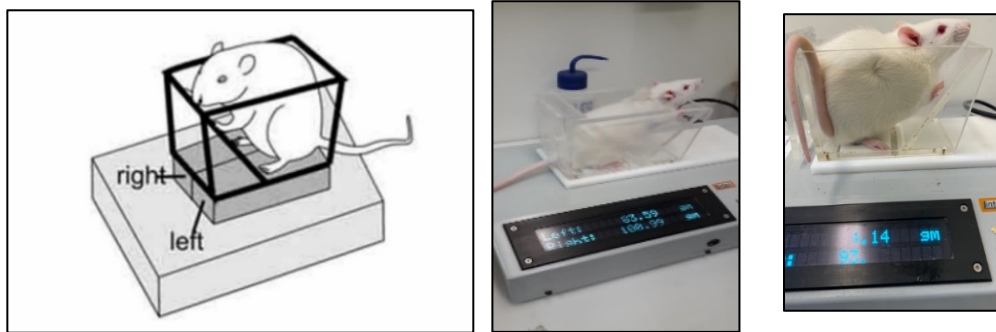


Figura 14: Painel A, B e C Imagens ilustrativas do teste “Static Weight Bearing” ou Teste de Incapacitância em ratos. As imagens dos painéis B e C foram tiradas no laboratório de neuroanatomia funcional da dor, no ICB 3 da Universidade de São Paulo.

3.7. Ensaio de Western Blotting:

Esse procedimento tem como objetivo a detecção de proteínas específicas em um tecido alvo e pode ser dividido em 5 principais fases, sendo elas: (1) extração e quantificação das proteínas; (2) fracionamento das proteínas da amostra em um gel de poliacrilamida; (3) transferências dessas proteínas para uma membrana; (4) incubação da membrana com um anticorpo para detectar a proteína específica a ser analisada; e (5) revelação dessa membrana para análise dos dados (Figura 15). Após os tratamentos (fotobiomodulação e exercício em meio aquático) e protocolos específicos para cada grupo, incluindo os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados, e realizada a coleta de material, sendo a retirada do músculo gastrocnêmio como tecido de interesse. O músculo gastrocnêmio dos animais foi submetido ao congelamento em nitrogênio líquido e permaneceram em freezer a -80°C até o momento de análise. A extração de proteína total do tecido foi realizada utilizando um tampão de lise (90mM KCl, 10mM Hepes, 3mM MgCl_2 , 5mM EDTA, glicerol 1%, 1mM DTT, 0,04% SDS, 20mM Aprotinina, 20mM Pepstatina, 20mM, Leupeptatina, 40 μM PMSF, 100mM Ortovanadato). O material teve seu conteúdo proteico isolado e dosado pelo método de Bradford. Após a quantificação de proteína total, os materiais foram diluídos em um mesmo volume de tampão Laemmli, contendo 54 mg/ml de DTT, em seguida as amostras foram fervidas em banho-maria por 5 min, para que o material fosse aplicado em gel de poliacrilamida (gel de gradiente 12%), este que foi submetido a eletroforese com corrente contínua de 120 V e corrente constante de 2500 mA. Com a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, 0,2 μm de diâmetro). Os antígenos presentes na membrana de nitrocelulose foram submetidos à caracterização imunoenzimática. Seguido de um bloqueio com leite desnatado 5% em tampão Tris-Salina (Tris 10 mM e NaCl 0,15 M, pH 7,5), por 2

horas, as membranas foram incubadas com o anticorpo monoclonal para marcador de crescimento muscular MYOD (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, UE) e PAX-7 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, UE) por 16 horas a 4°C. Em seguida, as membranas foram lavadas com Tris-Salina e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário feito em “mouse” (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, UE)[101, 102]. Seguido esse processo, as membranas foram reveladas em aparelho UVITEC utilizando o Kit ECL de quimioluminescência (Amershan Biosciences, NJ/EUA) e foram analisadas quanto à densidade das bandas marcadas, utilizando o programa Image J (NIH, MD/EUA). A correção foi realizada pela densidade óptica para a GAPDH (1:5000 Sigma, St. Louis, MO/EUA).

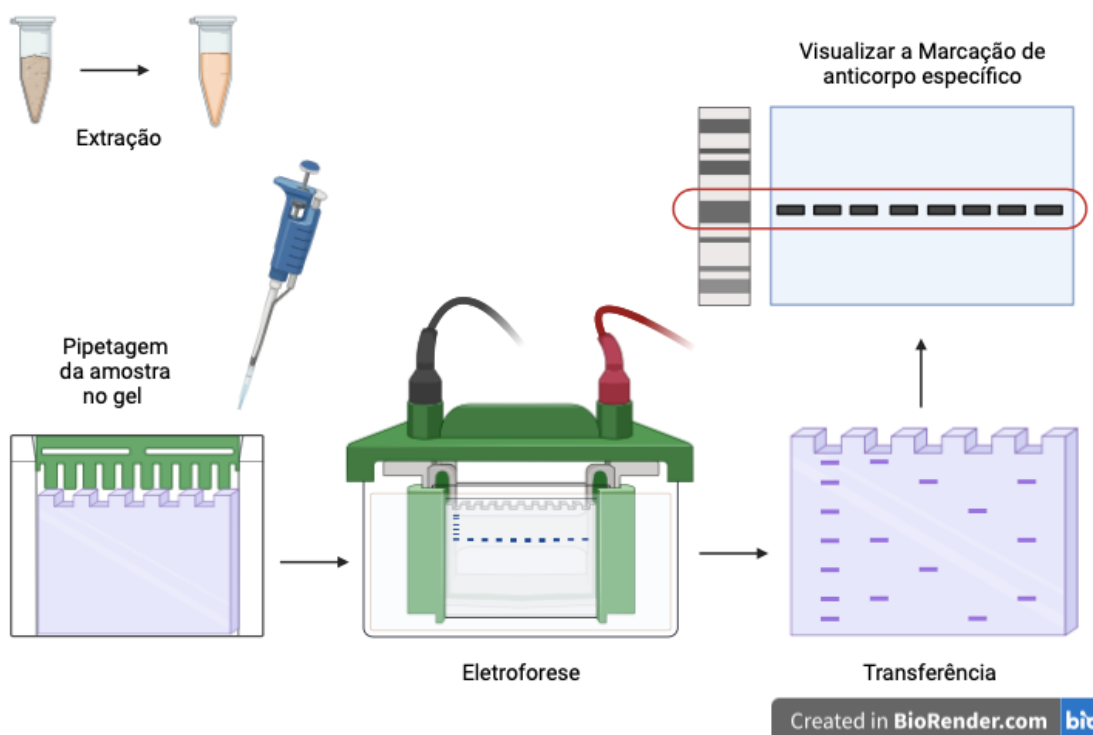


Figura 15: Imagem Representativa da técnica de Western Blotting, montada no aplicativo biorender.

3.8. Técnicas de Coloração:

Após a coleta do músculo gastrocnêmio, realizamos secções transversais de 10 µm de espessura no ventre do músculo gastrocnêmio com o auxílio de equipamento criostato (Leica CM3050). As lâminas de ventre muscular foram coradas com a técnica de Hematoxilina-Eosina (HE), para evidenciar os componentes celulares [80, 103-105], e para destaque do tecido conjuntivo e colágeno associado foi utilizado Picro-sírius red [105, 106] sendo assim possível avaliar qualitativamente e comparar o processo inflamatório e fibrótico em nossos grupos

experimentais (Figura 16). As imagens (n = 12 imagens por animal por grupo) foram obtidas com o auxílio do microscópio de luz (Nikon, modelo E800) e mensuradas por meio do software ImageJ® este que foi previamente calibrado para a % de área. Para dar início a mensuração é necessário selecionar a aba “Set Scale/Analyze”, seguido da aba “Image” pelas opções “Type/RGB Stack” e selecionar a demarcação evidente do tecido analisado, pôr fim a tecla M deve ser pressionada para apresentação dos resultados, sendo nosso foco a % de área.

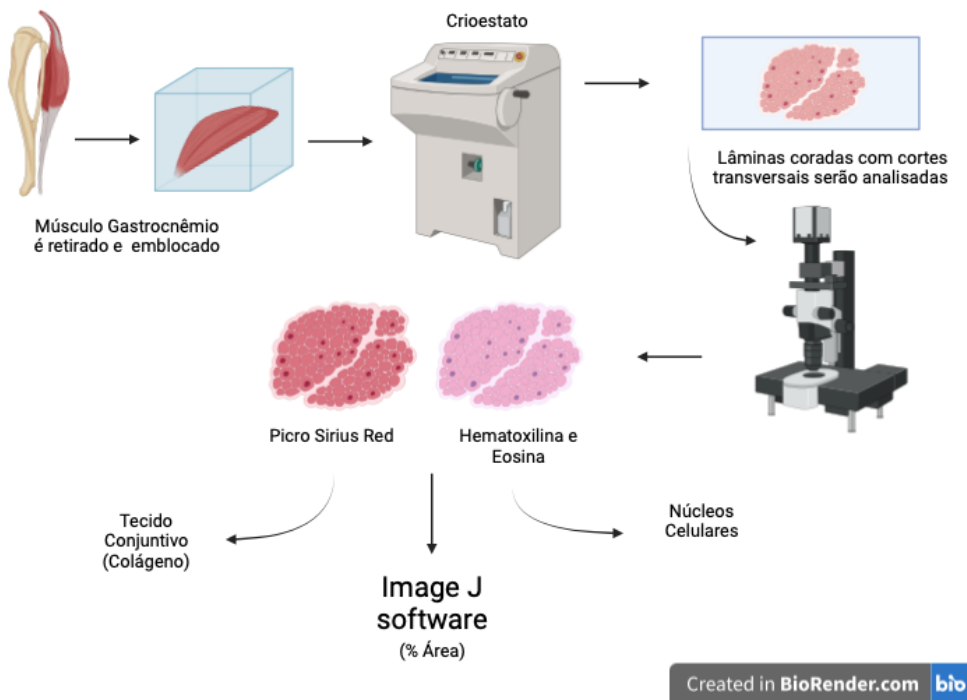


Figura 16: Imagem Representativa das técnicas de Coloração montada no aplicativo biorender.

3.9. Análise estatística:

Os dados apresentados como média \pm E.P.M. A análise estatística foi gerada utilizando o programa GraphPad Prism versão 8 (utilizando-se GraphPad Software Inc., CA, USA). A comparação estatística entre os grupos foi realizada usando a análise de variância de duas vias (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. O índice de significância considerado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio Comportamentais:

Para a análise dos resultados das técnicas comportamentais, podemos dividir nossos resultados em três grupos: grupos Exercício; grupos Fotobiomodulação (FBM); e grupos

Exercício + Fotobiomodulação (FBM), que foram utilizados para a comparação em todas as análises comportamentais. Para todos utilizamos a legenda abaixo para facilitar o entendimento:





M0 - Medida na chegada dos animais

MI - Medida pós Adaptação

M1- Medidas pós cirúrgicas (15 dias após CCI- cirurgia)

M2, M3, M4 - Medidas com tratamentos (Primeira semana de tratamento – 22 dias pós CCI/SHAM; segunda semana de tratamento – 29 dias pós CCI/SHAM; terceira semana de tratamento – 36 dias pós CCI/SHAM)

As cores abaixo representam, o período em que os animais passaram pelo tratamento e estão representadas nos gráficos.

-  Adaptação ao meio aquático
-  Treinamento Aquático
-  Tratamento de Fotobiomodulação
-  Treinamento Aquático associado com o tratamento de Fotobiomodulação

Cabe mencionar, que em todas as imagens representamos a pata ipsilateral. A pata contralateral foi medida, porém, não foi possível observar alteração estatística entre nenhum dos grupos analisados, portanto, optamos por não apresentar os resultados.

4.1.1. Efeito das terapias na resposta à hiperalgesia mecânica:

Os resultados em relação a análise comportamental de hiperalgesia mecânica foram utilizados os testes de Randall (Figura 17, Painel A-C) e o Teste de Von Frey Eletrônico (Figura 1, Painel D-F), a partir destes testes pudemos observar que após a lesão (CCI) foi possível visualizar uma diminuição do limiar nociceptivo a partir do 15º dia após cirurgia (M1) e se manteve ao longo de todas as medidas (M2, M3 e M4) Figura 17. Após o tratamento com exercício em meio aquático (CCI + Exercício), observamos uma melhora do quadro nociceptivo a partir da segunda semana de tratamento que se manteve até a última sessão (M3; $p < 0,0126$ e M4; $p < 0,0127$) em comparação ao grupo CCI, sem tratamento (Figura 17 A). Por outro lado, não foi possível observar alteração na resposta a hiperalgesia mecânica no grupo tratado apenas com PBMT (Figura 17 B). No entanto, ao tratar os animais com ambas as técnicas (CCI+ Exercício+ FBM), a melhora do quadro nociceptivo foi observada a partir da primeira sessão

(M2; $p < 0,0007$; M3; $p < 0,0001$; M4; $p < 0,0022$) em relação ao grupo sem tratamento (CCI) (Figura 17 C).

Em relação ao teste de Von Frey, pudemos observar uma diferença estatística apenas nos grupos tratados com fotobiomodulação (CCI + FBM) começando a partir da primeira semana de tratamento até a última (M2; $p = 0,0213$; M3; $p = 0,0023$; M4; $p = 0,0104$) quando comparado com o grupo CCI (Figure 16 E).

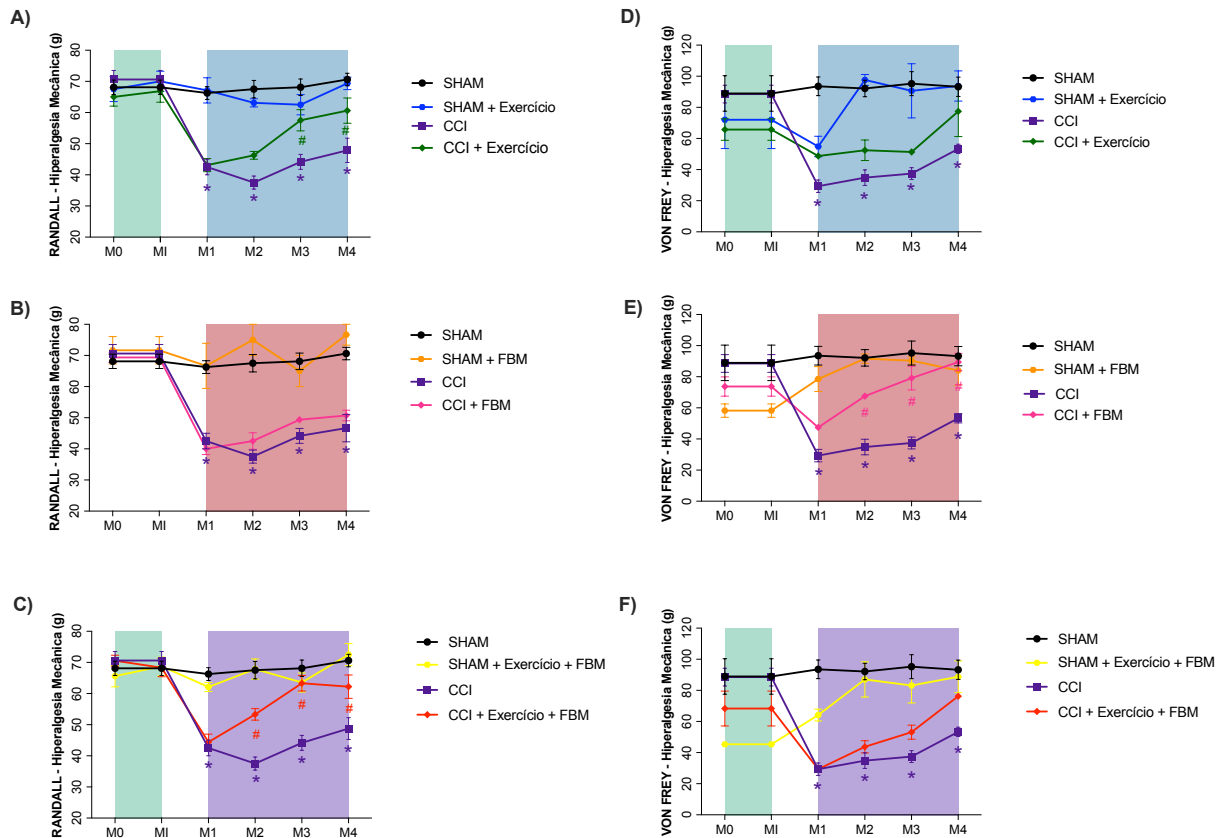


Figura 17 – Análise comportamental da hiperalgesia mecânica pelos testes de Randall (painéis A-C) e Von Frey (painéis D-F). Ambos os testes têm seus resultados expressos como força, em gramas (g). A força dos animais foi definida antes de qualquer procedimento (medida inicial; M0), após o período de adaptação (M1), 15 dias após cirurgia (M1) e após tratamentos (M2 – primeira semana – 22 dias pós-cirurgia), (M3 – segunda semana – 29 dias pós-cirurgia), (M4 – quarta semana 36 dias pós-cirurgia). Os resultados apresentam a média \pm E.P.M. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey. Os símbolos (*) representa diferença estatística entre o grupo SHAM e o grupo CCI; O símbolo (#) foi utilizado para mostrar a diferença estatística entre os animais lesionados (CCI) e os tratados (CCI + Exercício ; CCI + FBM ; CCI + Exercício + FBM).

4.1.2. Efeito das terapias na resposta ao estímulo térmico:

Os resultados em relação a análise comportamental dos testes de hiperalgesia térmica (Figura 18, Painel A-C) e alodinia ao frio (Figura 18, Painel D-F), demonstraram, após a lesão (CCI), uma diminuição do limiar nociceptivo a partir do 15º dia após cirurgia (M1). Essa diminuição do limiar nociceptivo se manteve ao longo de todas as medidas (M2, M3 e M4) Figura 18. Em relação ao teste de hiperalgesia térmica (Hargreaves) foi possível observar uma melhora do quadro nociceptivo no grupo tratado apenas com exercício ao meio aquático (CCI + SW) em relação ao grupo sem tratamento (CCI) (Figura 18, Painel A). Cabe mencionar, que a reversão do quadro nociceptivo só foi observada a partir da terceira semana de tratamento (M4; $p < 0.0311$). Não foi possível observar alteração estatística entre os grupos CCI e CCI tratado com FBM (Painel B) ou mesmo quando utilizamos ambos os tratamentos (CCI + Exercício + FBM- Painel C).

Em relação ao teste de alodinia ao frio foi observada uma melhora do quadro algico a partir da última semana de tratamento com exercício (CCI+SW; Painel D) em relação aos animais sem tratamento (CCI) (M4; $p < 0,0001$). Já, quando tratamos os animais com fotobiomodulação (CCI+FBM; Painel E), essa melhora foi observada após a segunda semana de tratamento (M1; $p < 0,0497$; M3; $p < 0,0002$; M4 ; $p < 0,0001$). No entanto, quando os animais foram tratados com a associação de ambas as terapias (CCI+SW+FBM; Painel F) essa melhora foi observada apenas após o término do tratamento (M4; $p < 0,0001$).

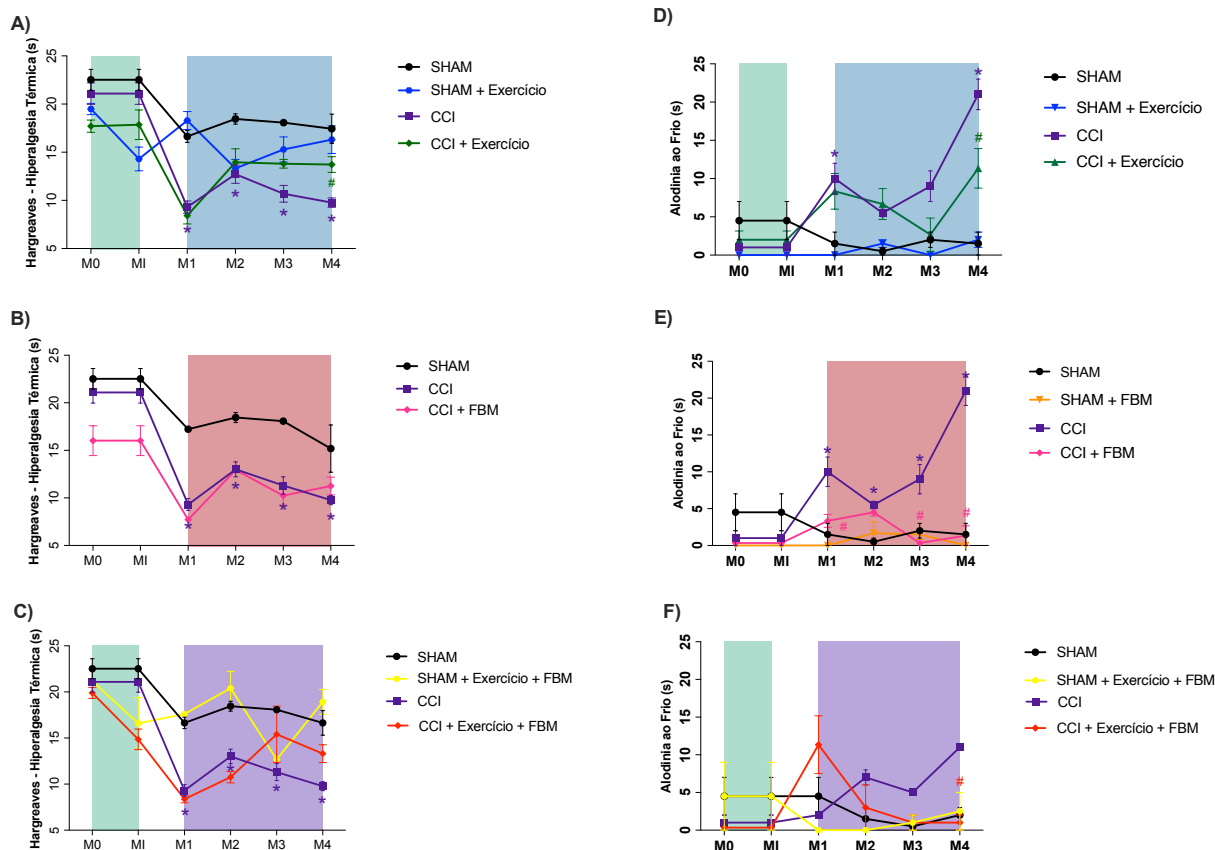


Figura 18 –Análise comportamental da hiperalgesia térmica (Painel A - C) e alodinia ao frio (Painel D - F). Os resultados de ambos os testes foram expressos em segundos (s). Definido antes de qualquer procedimento (medida inicial; M0), após o período de adaptação (M1), 15 dias após cirurgia (M1) e após tratamentos (M2 – primeira semana – 22 dias pós-cirurgia) e (M3 – segunda semana – 29 dias pós-cirurgia) (M4 – quarta semana 36 dias pós-cirurgia). Os resultados apresentam a média \pm E.P.M. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey. Os símbolos (*) representa diferença estatística entre o grupo FOP e o grupo CCI; O símbolo (#) foi utilizado para mostrar a diferença estatística entre os animais lesionados (CCI) e os tratados (CCI + Exercício; CCI + FBM ; CCI + Exercício + FBM).

4.1.3 Efeito dos tratamentos na função motora através do uso do teste de incapacitância.

Os resultados em relação a análise da diferença entre os membros lesionados (ipsilateral) e não lesionados (contralateral), demonstraram que após a lesão (CCI) foi possível observar uma diminuição da diferença entre os membros a partir do 15º dia após cirurgia (M1) (Figura 19). Com relação aos grupos tratados com exercício (Painel A), foi possível observar uma diminuição na diferença entre os membros na segunda semana de tratamento (M3; $p < 0,0447$; Figura 19A). Não foi possível observar diferença estatística em relação a terapia de fotobiomodulação ou mesmo quando ambas as terapias foram associadas (Painel B e C).

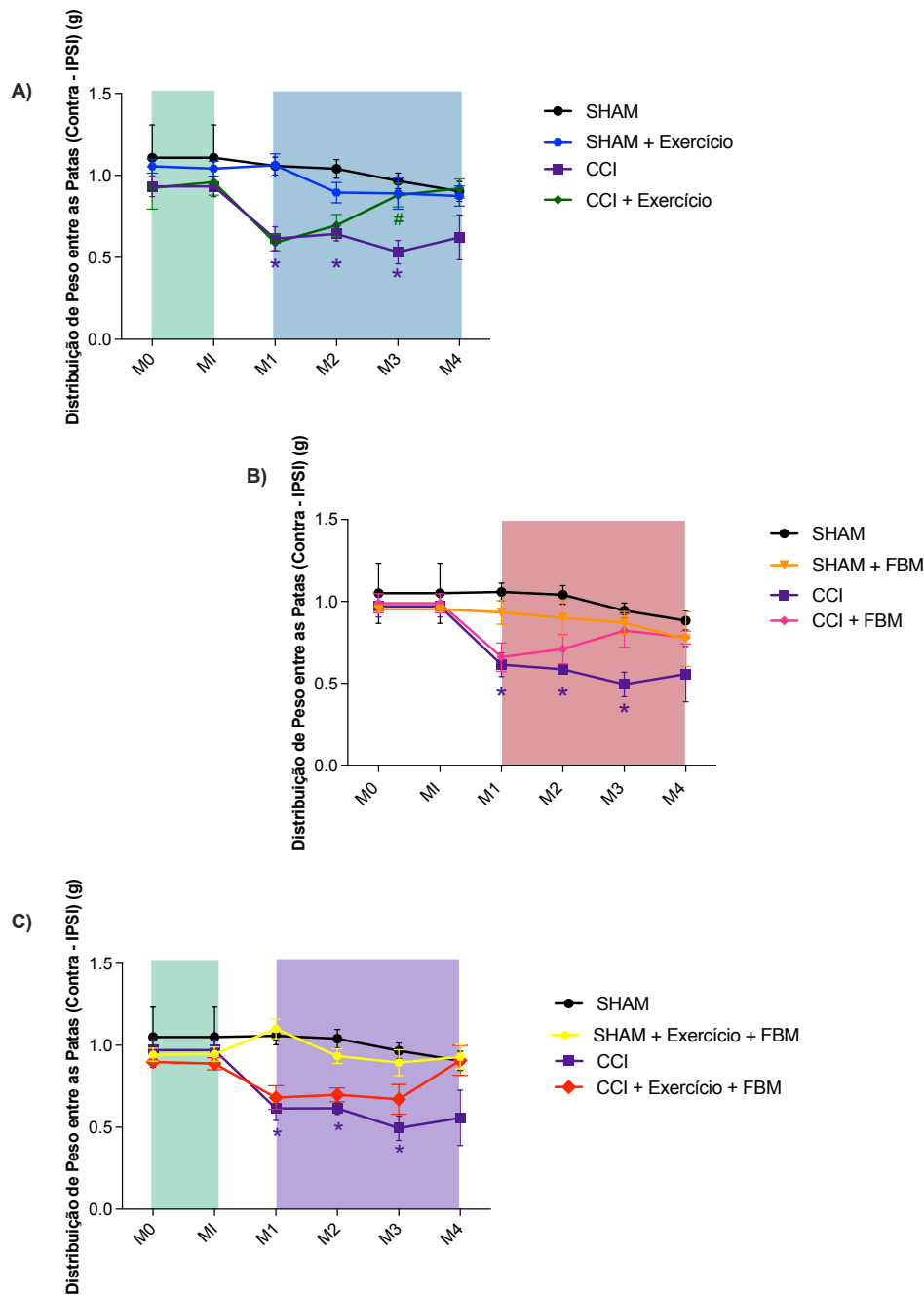


Figura 19 – Análise comportamental da Incapacitância dos animais tratados com exercício em meio aquático (Painel A), com fotobiomodulação (Painel B) e com ambas as técnicas (Painel C). Os resultados dos testes de incapacitância foram expressos através da diferença entre o membro ipsilateral dividido pelo membro contralateral. A medida basal dos animais foi definida antes de qualquer procedimento (medida inicial; M0), após o período de adaptação (MI), 15 dias após cirurgia (M1) e após tratamentos (M2 – primeira semana – 22 dias pós-cirurgia), (M3 – segunda semana – 29 dias pós-cirurgia), (M4 – quarta semana 36 dias pós-cirurgia). Os resultados apresentam a média \pm E.P.M. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey. Os símbolos (*) representa diferença estatística entre o grupo SHAM e o grupo CCI; O símbolo (#) foi utilizado para mostrar a diferença estatística entre os animais lesionados (CCI) e os tratados com exercício (CCI + Exercício).

4.2 Diferenças na musculatura dos animais

As imagens a seguir tem a função apenas de ilustrar a alteração do tamanho dos músculos dos animais em seus diferentes grupos (Figura 20). Para tanto, após a eutanásia, fotos foram retiradas para melhor ilustrar. Na Imagem abaixo, Painel A, observamos o grupo SHAM, sem nenhum tipo de tratamento, onde podemos observar um músculo íntegro. Após lesão (CCI- Painel B) observamos um músculo atrofiado, com sua massa muscular muito reduzida em comparação aos animais controle. Após tratamento com exercício (CCI + Exercício, Painel C ou com a associação de ambas as técnicas (Painel E, CCI + Exercício + FBM) observamos um regressão ao estado basal do músculo, sendo portanto a hipertrofia do músculo, que anteriormente se encontrava atrofiado. E como mostrado visualmente, após o tratamento com FBM isolado, não foi possível observar alteração de tamanho em relação ao grupo doente (Painel D), mostrando que o tratamento isolado com a fotobiomodulação não é eficaz na hipertrofia muscular.



Figura 20 – Imagens realizadas na eutanásia dos animais, Ilustrativa da diferença de tamanho do músculo dos animais. Painel A – SHAM ; Painel B – CCI ; Painel C – CCI + Exercício; Painel D – CCI + FBM; Painel E – CCI + Exercício + FBM

4.3 Ensaios de *Western Blotting* no músculo gastrocnêmio

Em relação aos resultados, esses foram obtidos através da análise da expressão proteica realizada pela técnica de *Western blotting* para as proteínas Pax-7 e MYOD. Para a análise de tais proteínas foi utilizada a técnica de normalização onde a densidade óptica da quantificação proteica corresponde à razão proteína de proteína de interesse/GAPDH e representado em porcentagem. Cabe mencionar que utilizamos apenas o lado ipsilateral do ventre muscular para análise.

4.3.1 Quantificação proteica de Pax7

Após a avaliação dos testes comportamentais e tratamentos específicos de natação e fotobiomodulação, os animais foram eutanasiados no 37º dia pós cirurgia, onde o músculo gastrocnêmio ipsilateral foi coletado, armazenado e processado para o ensaio de *Western blotting*. A fim de analisar e quantificar a expressão de proteína Pax7, importante transcritor muscular na regeneração, realizamos a análise no músculo gastrocnêmio dos animais. Em nossas análises, pudemos observar, um leve aumento na expressão de pax-7 no grupo CCI em relação aos outros grupos, contudo esse aumento não foi estatisticamente diferente (Figura 21). Com relação aos grupos tratados com exercício (Painel A), fotobiomodulação (Painel B) ou com ambas as terapias (Painel C) podemos observar, que todos os tratamentos foram capazes de induzir uma expressão menor do pax-7 em relação ao grupo lesionado (CCI). Contudo essa diminuição não foi estatisticamente diferente.

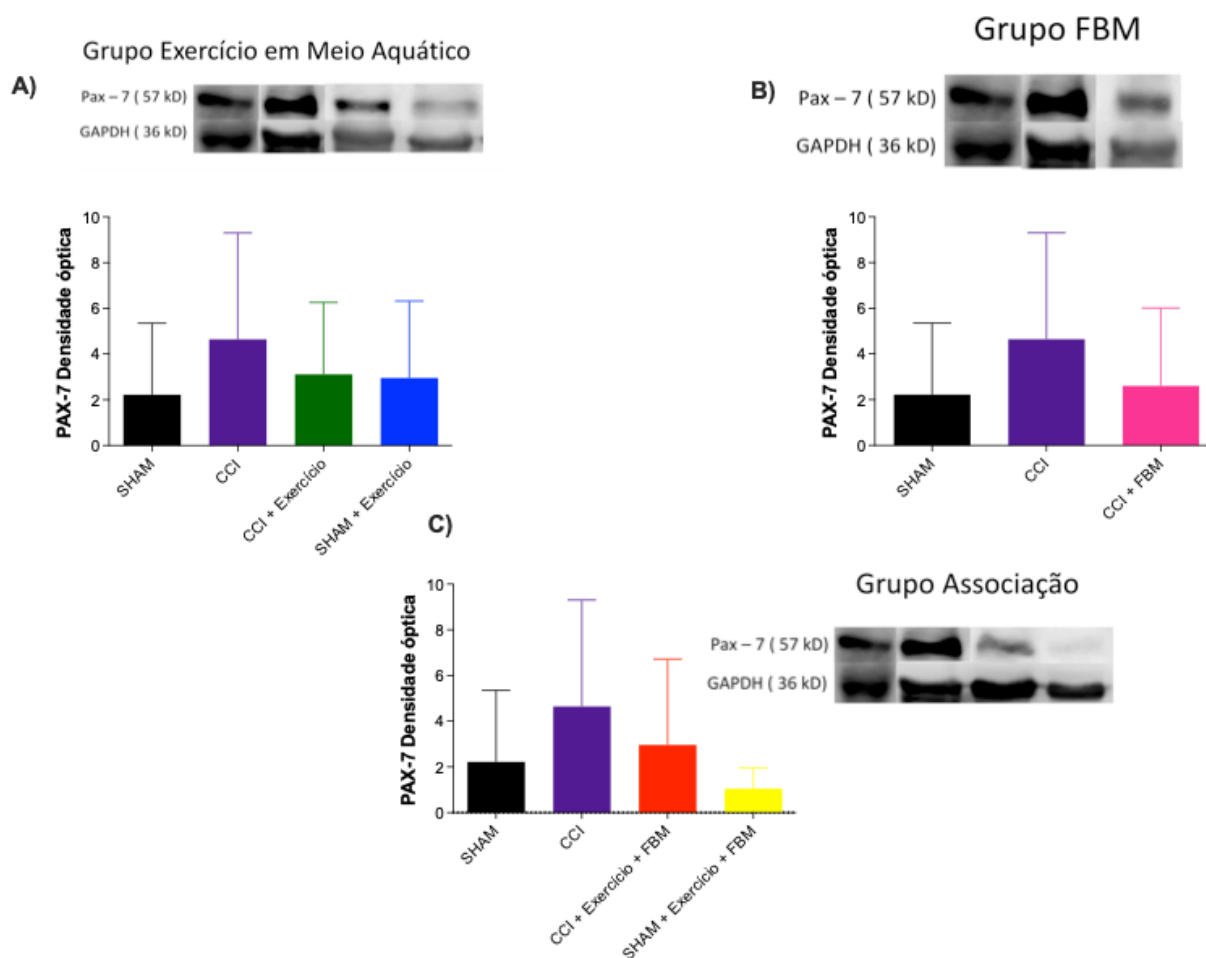


Figura 21 – Gráfico de barras representando a expressão proteica do anticorpo Pax-7 no músculo gastrocnêmio ipsilateral dos animais tratados com exercício (Painel A), fotobiomodulação (Painel B) e com ambas as terapias (Painel C). Nossos resultados representam a quantificação da expressão da proteína de Pax-7, com peso molecular de 57kDa. Os resultados apresentam a média \pm E.P.M. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey. O símbolo (*) representa diferença estatística entre o grupo CCI e os demais grupos, sendo no Painel A (SHAM; SHAM + Exercício; CCI + Exercício), no Painel B (SHAM; SHAM + FBM; CCI + FBM) e no Painel C (SHAM; SHAM + Exercício + FBM; CCI + Exercício + FBM).

4.3.2 Quantificação proteica de MYOD

Em nossas análises, pudemos observar que o grupo lesionado (CCI) apresenta uma quantidade mínima de expressão de proteína MYOD (Figura 22). Em relação aos animais tratados com exercício, podemos observar um aumento nos níveis de expressão de Myod quando comparado com o grupo CCI (Painel A). O mesmo foi observado no grupo que recebeu

tratamento com FBM, observamos um aumento na expressão dessa proteína após tratamento (Painel B). Porém, quando analisamos o tecido do grupo que recebeu ambos os tratamentos, os valores estavam semelhantes ao grupo lesionado (CCI- Painel C). Conforme descrito anteriormente, pretendemos adicionar um número maior de animais que confirmar esses resultados.

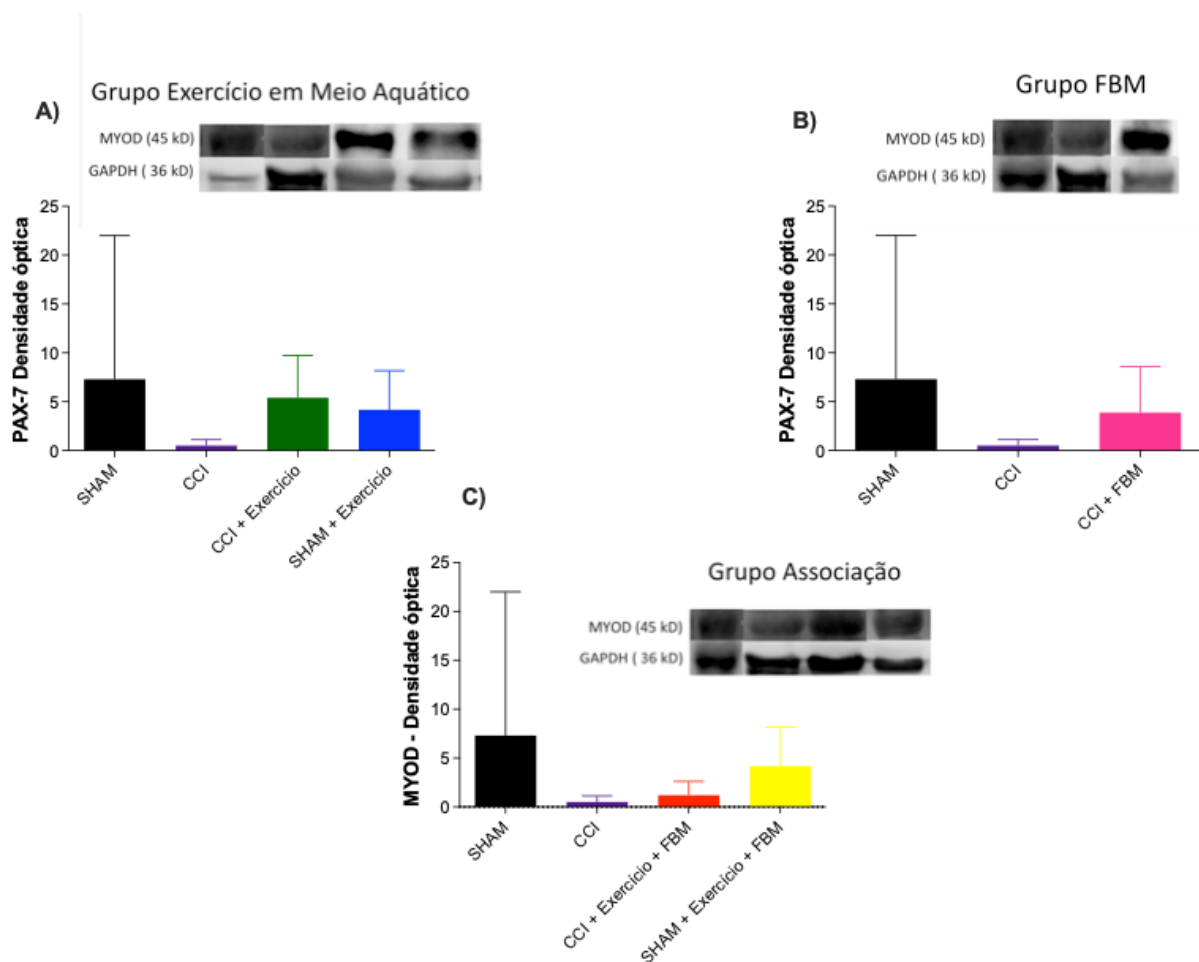


Figura 22 – Gráfico de barras representando a expressão proteica do anticorpo MYOD no músculo gastrocnêmio ipsilateral dos animais tratados com exercício (Painel A), com fotobiomodulação (Painel B) e com ambas as terapias (Painel C). Nossos resultados representam a quantificação da expressão da proteína de MyoD, com peso molecular de 45kDa. Os resultados apresentam a média \pm E.P.M. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey. O símbolo (*) representa diferença estatística entre o grupo CCI e os demais grupos, sendo no Painel A (SHAM; SHAM + Exercício; CCI + Exercício) , no Painel B (SHAM; SHAM + FBM ; CCI + FBM) e no Painel C (SHAM; SHAM + Exercício + FBM ; CCI + Exercício + FBM).

4.4 Disposição dos grupos celulares - Hematoxilina e Eosina (HE)

Após a avaliação dos testes comportamentais e tratamentos específicos, conforme já mencionados anteriormente, os animais foram eutanasiados no 37º dia pós cirurgia, o músculo gastrocnêmio ipsilateral foi coletado a fresco, emblocado e congelado, vale ressaltar que o mesmo músculo foi utilizado para as técnicas de Hematoxilina e Eosina e a técnica de Picro Sirius Red. A seguir o material foi seccionado e distribuído em lâminas gelatinizadas para a técnica de Hematoxilina e Eosina. Os cortes transversais corados com HE foram analisados através de microscópio óptico para avaliação qualitativa do comprometimento tecidual e da progressão dos núcleos celulares na região (Figura 23). Foi possível observar que no grupo SHAM os núcleos se situam paralelos às fibras musculares, sendo um aspecto padrão a morfologia tecidual do músculo estriado esquelético dos animais. Já no grupo CCI foi possível identificar um acúmulo massivo de núcleos celulares e algumas fibras com núcleos centralizados como tentativa de recuperar tais fibras musculares, além do calibre das fibras musculares (e do próprio músculo) se encontrarem menores em relação ao grupo controle. Em relação aos animais tratados (CCI + Exercício; CCI + FBM; CCI + Exercício + FBM) é possível observar ainda um acúmulo maior de núcleos centralizados devido a neuropatia induzida pelo CCI, contudo nos grupos tratados com exercício já é possível observar que as células musculares vão retomando ao seu tamanho habitual, também já aparentam sinais de regeneração com aspectos circulares e os núcleos da região apresentam dissipação em relação ao Grupo CCI. Quando os animais foram tratados com Fotobiomodulação e a associação de ambas as técnicas, apresentam um aspecto similar ao grupo controle, com os núcleos se situam paralelos às fibras musculares, sendo um aspecto padrão a morfologia tecidual do músculo estriado esquelético dos animais. Contudo o grupo Fotobiomodulação apresenta um aspecto padronizado das fibras circulares, ainda com alguns núcleos adicionais no interstício e onde as células não são bem delimitadas como podemos ver nos grupos controle e associação (Figura 23).

Após a captação das imagens, nosso próximo passo foi quantificar as imagens. Nossos resultados (Figura 24) demonstram um aumento de 660% de núcleos inflamatórios no grupo lesionado (CCI) em relação ao controle (SHAM, considerado 100%). Após os diferentes tratamentos pudemos observar diminuição da porcentagem desses núcleos centralizados, em relação ao grupo CCI. Essa diminuição foi de 45% (Painel A) para o grupo tratado com exercício (CCI + Exercício), 67% para o grupo Fotobiomodulação (CCI + FBM) (Painel B) e 76% para o grupo associação (CCI + Exercício + FBM) (Painel C).

Hematoxilina e Eosina

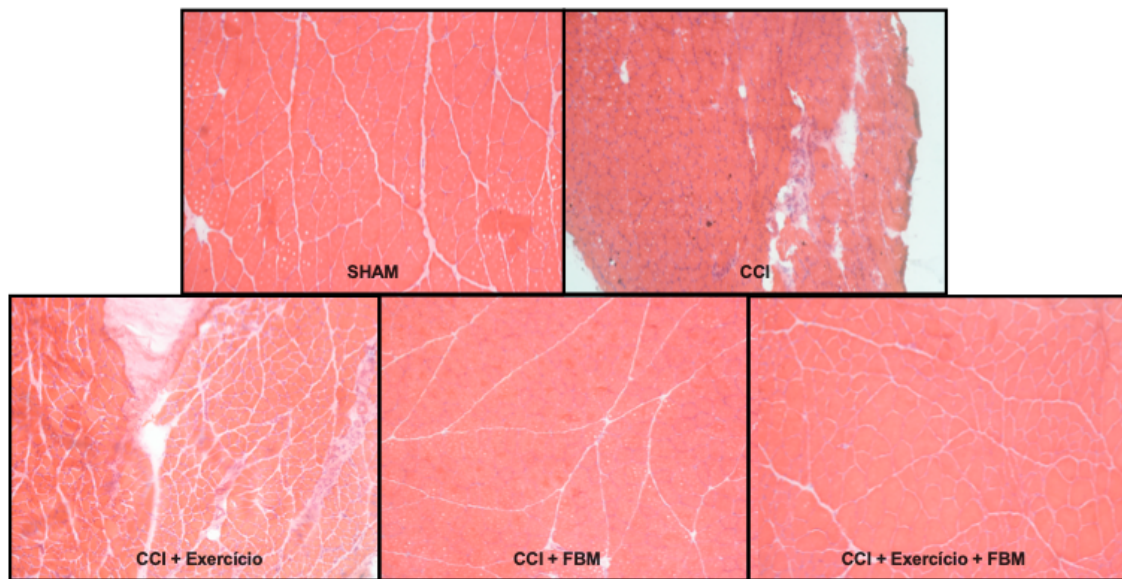


FIGURA 23- Cortes transversais corados com a técnica de Hematoxilina e Eosina. (Objetiva de 10x)

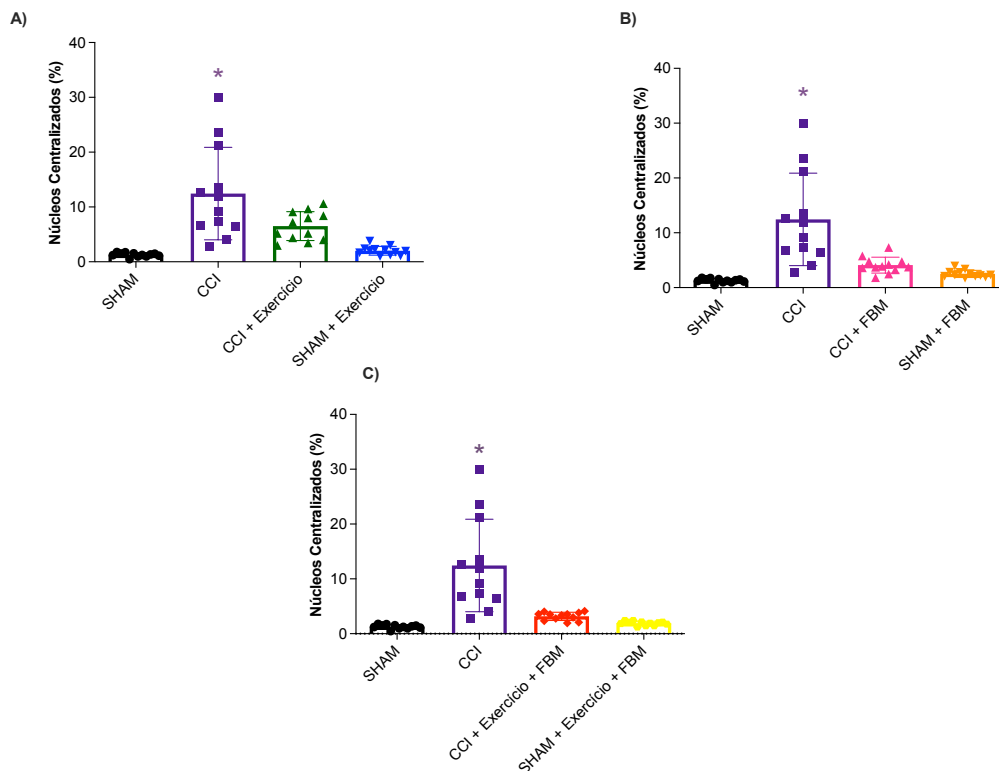


Figura 24 – Gráfico de barras representando a expressão de células inflamatórias no músculo gastrocnêmio ipsilateral dos animais tratados com exercício (Painel A), com fotobiomodulação (Painel B) e com ambas as terapias (Painel C). Os resultados apresentam a média \pm E.P.M. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey. Os símbolos (*) representa diferença estatística entre o grupo CCI e demais grupos.

4.5 Caracterização do Colágeno Intersticial - Picro Sirius Red

Como mencionado anteriormente, parte do material foi utilizado para a técnica de Picro Sirius Red. Os cortes transversais foram corados e analisados através de microscópio óptico para avaliação qualitativa da morfologia do colágeno total e entre as fibras e para a identificação das regiões com fibrose tecidual. No grupo controle [92], foi possível observar o aspecto padrão de colágeno intersticial entre as fibras musculares e a disposição destas fibras e congruência. Já no grupo CCI, observamos um acúmulo abundante de colágeno e aspectos fibróticos com a descaracterização das fibras musculares e diminuição do calibre das mesmas. Nos grupos tratados, foi possível observar uma diminuição da expressão do colágeno e aspectos fibróticos, sendo quase uma reversão total do quadro em relação aos animais lesionados e controle. Também é interessante citar que os grupos tratados (CCI + Exercício; CCI + PBM ; CCI + Exercício + FBM) apresentam uma redução do colágeno total (%) e entre as fibras musculares em comparação com o grupo SHAM e CCI (Figura 25). O mesmo que observamos no experimento anterior. Nossos resultados demonstram um aumento de 203% de colágeno no grupo lesionado (CCI) em relação ao controle (SHAM, considerado 100%). Após tratamentos pudemos observar uma diminuição do colágeno total (Figura 26). Essa diminuição foi de 62 % (Painel A), 58 % para o grupo Fotobiomodulação (CCI + FBM) (Painel B) e 66% para o grupo associação (CCI + Exercício + FBM) (Painel C).

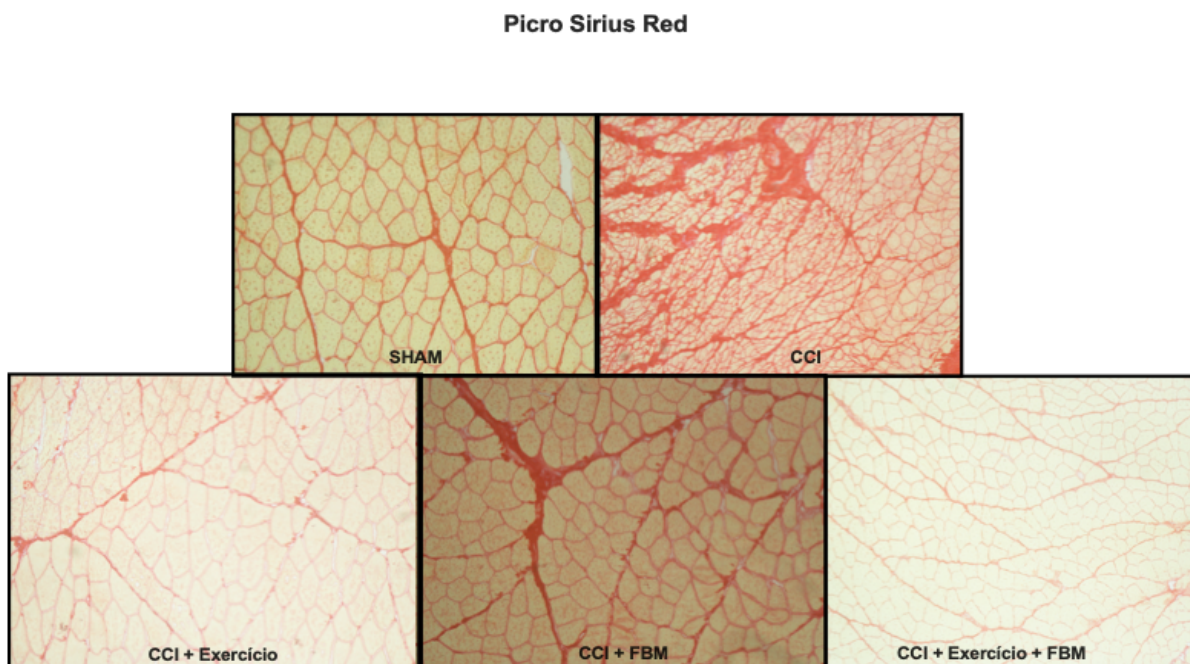


Figura 25 – Cortes transversais corados com a técnica de Picro Sirius Red. (Objetiva de 10x)

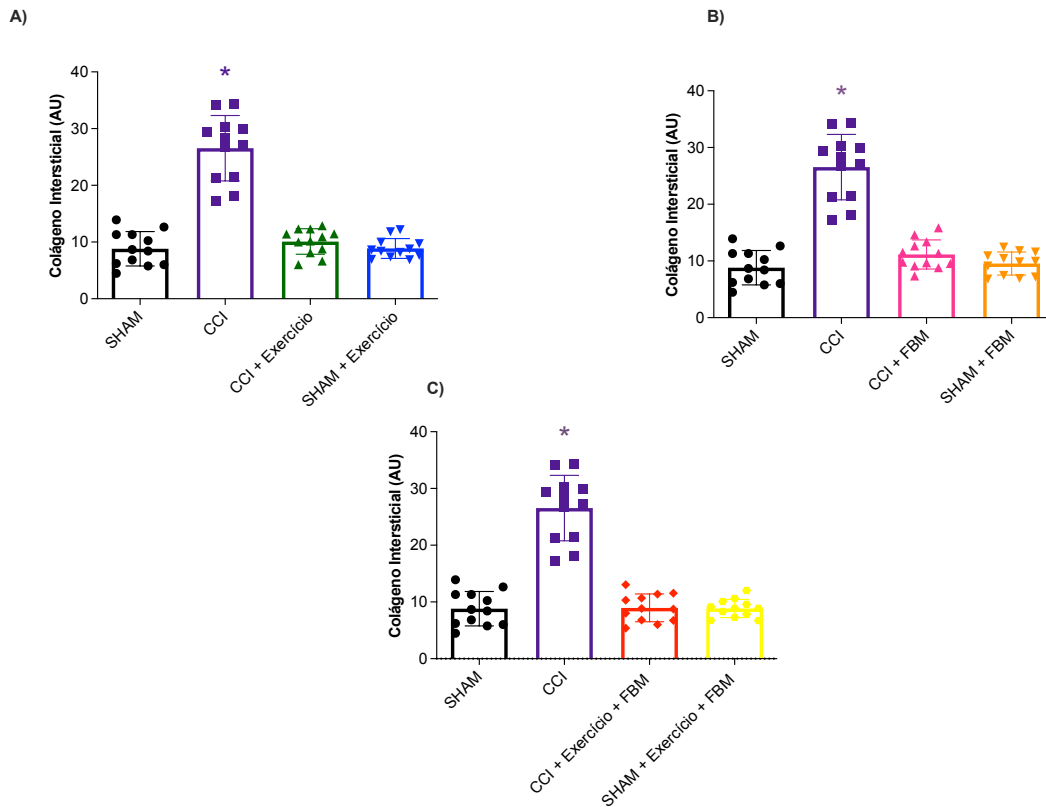


Figura 26 – Gráfico de barras representando a expressão de colágeno no músculo gastrocnêmio ipsilateral dos animais tratados com exercício (Painel A), com fotobiomodulação (Painel B) e com ambas as terapias (Painel C). Os resultados apresentam a média \pm E.P.M. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey. Os símbolos (*) (*) representa diferença estatística entre o grupo CCI e demais grupos.

5. DISCUSSÃO

A dor neuropática é definida por danos, doença, lesão e pressão no sistema nervoso periférico (SNP), central (SNC) e nervoso somatossensorial [3, 107]. É uma condição comum de dor crônica que possui grande impacto na qualidade de vida dos indivíduos, afetando cerca de 7-10% da população geral global [108]. Tendo sua predominância em pacientes acima de 50 anos de idade, difícil tratamento e sem cura.

Alternativas não medicamentosas se fazem necessárias para uma melhora na qualidade de vida do paciente, visto que os tratamentos medicamentosos ainda não são totalmente eficazes e apresentam efeitos colaterais adversos ao indivíduo [3, 4, 13-15, 22, 67, 68, 109]. Com embasamento na literatura e pensando na qualidade de vida e tipo de dor que esses pacientes sofrem com os diversos problemas causados pela dor neuropática (como a atrofia muscular ou o desuso dessa musculatura adjacente a lesão), desenvolvemos nosso trabalho para duas diferentes vertentes de terapia, a fotobiomodulação e o exercício em meio aquático, associados ou isolados.

A fotobiomodulação já apresenta resultados positivos na literatura em diversos tecidos e diferentes doenças relacionadas a dor neuropática [22, 69, 71-82, 84, 110], da mesma forma, o exercício em meio aquático também apresenta, na literatura, resultados positivos em relação a esse tipo de dor [2, 8, 55-62, 111]. Porém, pouco se sabe sobre o efeito dessas terapias no tecido muscular, quando falamos do modelo de constrição do nervo isquiático. Não foram encontrados estudos onde tais terapias fossem associadas e analisadas neste tecido. Portanto, nosso intuito foi identificar se a associação de ambas as terapias teria um efeito benéfico no tecido muscular, e se possivelmente encontraríamos um efeito potencializado após ambas as terapias.

De maneira geral, nossa hipótese de que a associação de ambas as terapias poderia ter efeito potencializado em relação a resposta nociceptiva e motora, não foi confirmada por completo. Os grupos tratados com ambas as terapias apresentaram resultados benéficos apenas em relação a diminuição da resposta nociceptiva quando avaliada em modelo de hiperalgesia mecânica e térmica (especificamente ao frio).

Inicialmente avaliamos cada terapia de forma individualizada e posteriormente associamos e comparamos cada uma delas. Sobre os grupos tratados com o exercício em meio aquático, nossos resultados demonstraram uma melhora do quadro algico em resposta ao ensaio de hiperalgesia mecânica (Randall) e térmica (quente e frio). Essa melhora do quadro nociceptivo foi observado após a segunda semana de tratamento para o teste de hiperalgesia mecânica (Randall & Selitto). Nenhuma alteração foi observada quando os animais foram avaliados em resposta a hiperalgesia mecânica no teste de Von Frey. Em relação a hiperalgesia térmica (Hargreaves), foi possível observar diminuição a hipersensibilidade ao calor após a terceira semana de tratamento, o mesmo resultado foi observado para a hipersensibilidade ao frio.

Nossos resultados corroboram com os obtidos por Fazard et al., (2018) visto que em seu trabalho a partir da terceira semana de tratamento, em meio aquático, foi observada uma melhora no quadro nociceptivo em relação a hiperalgesia mecânica e térmica nos animais lesados (modelo de CCI) [56]. Ainda corroborando com nossos resultados, outros estudos também demonstram efeito benéfico do exercício aquático reduzindo a resposta nociceptiva. Como o estudo de Kuphal et al. (2007), onde observaram que o exercício aquático reduziu a alodinia ao frio e a hiperalgesia térmica [55].

Quando os animais foram submetidos a terapia de Fotobiomodulação de forma isolada, não foi possível observar alteração na sensibilidade ao estímulo mecânico quando utilizamos o teste de Randall & Selitto. No entanto, observamos um aumento do limiar nociceptivo quando

utilizamos o teste de Von frey. Essa melhora do quadro álgico foi observada a partir da primeira semana de tratamento. O mesmo foi observado quando confrontamos os animais com estímulo térmico, não observamos alteração estatística após o uso do estímulo quente, mas observamos reversão do quadro álgico quando submetemos os animais ao estímulo frio.

Estudos anteriores, realizados pelo nosso grupo de pesquisa já haviam demonstrado efeito benéfico da FBM em modular a resposta nociceptiva usando o mesmo modelo experimental e em outros modelos [18, 21, 81, 112]. No entanto, esses estudos, observaram uma reversão do quadro nociceptivo utilizando os três tipos de ensaios comportamentais. Esses resultados discrepantes podem ser devido a quantidade de sessões aplicadas por semana [81]. Ainda, nosso protocolo apresenta uma energia total diferente, variando número de sessões e/ou densidade de potência do aparelho, o que pode levar a resultados diferentes dentro do mesmo grupo de trabalho.

Quando nos deparamos com os animais que foram submetidos a associação de ambas as terapias, observamos melhora apenas quando submetemos os animais aos ensaios de hiperalgesia mecânica, e ao estímulo frio. Um fato interessante, foi que a melhora do quadro álgico após a associação foi observada de forma mais recente, ou seja, iniciou-se após a primeira semana, demonstrando assim um efeito benéfico quando associado ambas as terapias. Quanto à avaliação do estímulo frio, observou-se uma melhora comparável àquela alcançada com o tratamento de natação individual. No entanto, é importante destacar que o tratamento a laser demonstrou melhorias mais precoces, notadamente após a primeira semana de intervenção.

Em relação a avaliação da função motora dos animais, ou seja, a diferença de peso depositado nas patas ipsi e contralateral, realizada no teste de incapacitância, observamos uma melhora, a partir da segunda semana de tratamento nos animais que foram submetidos ao exercício em meio aquático, sem nenhuma alteração após tratamento com FBM ou mesmo durante associação de ambas terapias. Esse resultado foi um tanto surpreendente, pois esperávamos, como apresentado na resposta nociceptiva, um efeito positivo, quando associado ambas as terapias. No entanto, nossos resultados estão de acordo com resultados observados por Cobianchi, et al (2010) e Palandi (2020), onde também observaram uma melhora no quadro motor após o uso de exercício em esteira [15, 113].

Não temos na literatura trabalhos descritos com a terapia de FBM associada a natação no modelo de dor neuropática induzida pela constrição do nervo isquiático, contudo alguns resultados utilizando outros modelos experimentais, demonstraram efeitos benéficos na associação de ambas as terapias. Como por exemplo no estudo de Beasi et al. (2021) onde a combinação dessas duas terapias no processo de regeneração do músculo tibial anterior após a

criolesão demonstrou ser mais eficiente do que quando ambas terapias são aplicadas isoladamente [43]. Ainda, o estudo de Malta et al. (2020) sugeriu um efeito benéfico da FBM de forma individual ou em conjunto com suplemento de creatina durante programa de treinamento de 12 semanas, resultando um desempenho muscular significativamente melhor e níveis mais baixos de CK (marcador bioquímico de dano muscular) [114]. Ainda, trabalhos do grupo do Farazi et al. (2022) também demonstrou que a combinação de FBM e um ambiente recreativo pode ser eficiente na redução da depressão e comportamentos do tipo ansiedade em camundongos, possivelmente através da modulação do nível de corticosterona e da via hipocampal BDNF/TrkB/CREB [115]. Dutra et al. (2022) observou que, em humanos, a FBM melhora o desempenho da resistência muscular em exercícios uni articulares, mas não é eficaz para o desempenho da força muscular [116].

Esses dados, quando considerados em conjunto, evidenciam a eficácia de ambas as terapias na melhoria do quadro nociceptivo e/ou motor, dependendo do modelo e tratamento empregados. Além disso, ressalta-se o potencial impacto positivo dessas terapias não farmacológicas na qualidade de vida dos pacientes.

Adicionalmente aos ensaios comportamentais, a avaliação macroscópica do músculo revelou-se crucial para compreender o impacto das diferentes abordagens terapêuticas. Notou-se que os músculos dos animais lesados apresentaram menor tamanho em relação ao grupo controle. Após as terapias que envolviam exercícios em meio aquático de forma isolada ou em associação com a fototerapia, apresentaram significativo aumento de tamanho em comparação aos grupos lesionados e sem tratamento. Nenhuma alteração foi observada após o uso da FBM isoladamente. Esses resultados evidenciam a eficácia sinérgica das intervenções combinadas, refletindo em um desenvolvimento muscular notável. Curiosamente, os músculos dos animais tratados com as terapias mencionadas assemelharam-se visualmente aos dos animais do grupo SHAM, sugerindo uma recuperação muscular notável. Esta avaliação macroscópica não apenas destaca a eficácia das terapias, mas também fornece uma perspectiva tangível sobre o potencial impacto positivo dessas abordagens na restauração da morfologia muscular e, por extensão, na recuperação funcional.

Com o objetivo de analisar e quantificar a expressão das proteínas Pax7 e MyoD, fundamentais enquanto transceptores musculares no processo de regeneração, avaliamos a expressão dessas proteínas nos músculo gastrocnêmico dos animais após tratamentos de foram isolada ou em associação. A avaliação destas proteínas desempenha um papel crucial na compreensão dos mecanismos subjacentes à regeneração muscular, sendo a Pax7 associada à manutenção da reserva de células satélites, enquanto o MyoD desempenha um papel central na

diferenciação e maturação das células musculares. A quantificação precisa dessas proteínas proporcionará insights valiosos sobre o estado e a eficiência do processo de regeneração muscular, informando avanços significativos na compreensão e potencial manipulação desses eventos biológicos complexos.

Nossos resultados demonstraram um aumento da proteína PAX7 no grupo lesionado (CCI) em comparação ao controle e uma queda após tratamentos de forma isolada ou em associação. O inverso foi observado quando avaliamos os níveis de expressão de MYOD. Nossos resultados demonstraram uma diminuição dessa proteína após lesão e um aumento após tratamentos. No entanto, para ambos, não foi possível observar alteração estatística entre os grupos.

Trabalhos da literatura mostraram que Pax7 está relacionado com a proliferação, manutenção, prevenção da diferenciação celular [117], plasticidade muscular, além de coordenar a expressão de MRFs e MYOD [118]. O mesmo foi observado por Tian et. al., (2016) em modelo de contusão muscular, onde Pax7 e MYOD foram regulados positivamente pós lesão (21 dias)[119]. Ainda, Wang et al., (2011) observou que Pax7 e Pax3 regulam a expressão de Myod [38] e Yagi et al., (2021) observaram que a expressão de Pax7 é restrita às células satélites e é especificamente necessária para sua manutenção, enquanto os MRFs, incluindo Myf5, MyoD, Myog e Myf6 (MRF4), são ativados em estágios sucessivos para conduzir a miogênese[120].

Em 2015, foi observado por Roberts et al. que a imersão aquática atenua mudanças no número de células satélite e quinases que regulam a hipertrofia [121], Fujimaki também teve resultados positivos em seu trabalho quando associou o exercício a essa via muscular, tendo uma ativação de células satélite e recuperando a inatividade da sinalização celular em animais diabéticos [122]. Roman et al. (2021) observaram que lesões musculares derivadas do exercício físico ativam um mecanismo de auto reparação de miofibras independente de células satélite, o que leva a um aumento na velocidade de regeneração do sarcômero[123]. Nossos resultados corroboram com os anteriores descritos na literatura, visto que o grupo CCI com treinamento de exercício aquático teve uma diminuição na expressão de Pax7 e uma maior expressão de MYOD, o que demonstra uma possível correlação entre Pax7 e MYOD.

Um estudo mais recente, sobre doenças neuromusculares sugere aumento no número de células positivas para Pax 7 em biópsias de pacientes, indicando disfunção das células satélites e fibras musculares podem ser diretamente afetadas pela doença [33]. Ainda o estudo realizado pelo grupo de Azhar, no mesmo ano, mostraram que as células satélite além de estarem relacionadas com a cicatrização, são potenciais fatores de transcrição para a produção de proteínas de divisão celular [124].

A importância dos ensaios histológicos, como a coloração por hematoxilina e eosina (HE) e o picrossírius, é inquestionável no âmbito da pesquisa científica e clínica. Essas análises proporcionam uma visão detalhada das características microscópicas de tecidos e órgãos, permitindo a identificação de padrões morfológicos, a avaliação de alterações patológicas e a compreensão dos efeitos de diferentes tratamentos ou condições experimentais. No contexto da regeneração muscular, a aplicação desses ensaios histológicos é crucial para examinar a arquitetura e a composição do tecido, bem como para avaliar a natureza e a extensão de danos ou reparos. A coloração por HE, por exemplo, destaca a morfologia celular, enquanto o picrossírius é especialmente valioso na visualização de fibras colágenas. Essas técnicas não apenas enriquecem o entendimento científico, mas também desempenham um papel essencial no desenvolvimento de estratégias terapêuticas, oferecendo insights significativos para a otimização de intervenções médicas e terapias regenerativas.

Em relação as lâminas marcadas com hematoxilina e eosina, foi possível observar uma diminuição de núcleos centralizados em todos os grupos tratados isoladamente ou em conjunto em relação aos grupos CCI. Estes apresentaram acúmulo massivo de núcleos celulares e algumas fibras com núcleos centralizados como tentativa de recuperar tais fibras musculares. Já nos grupos tratados com exercício é possível observar que as células musculares vão retomando ao seu tamanho habitual, apresentando sinais de regeneração com aspectos circulares. Nos animais tratados com Fotobiomodulação e a associação de ambas as técnicas, é apresentado um aspecto similar ao grupo controle, onde os núcleos se situam paralelos às fibras musculares, sendo um aspecto padrão a morfologia tecidual do músculo estriado esquelético dos animais.

Tais resultados corroboram com nossa quantificação, ou seja, observamos um nível de núcleos inflamatórios aumentado em 660% em relação ao controle. E uma diminuição da inflamação em 45% nos grupos apenas exercitados, 67% grupo tratado com Fotobiomodulação e 76% para o grupo associação.

Com relação as lâminas apresentadas para a coloração de Picro Sirius Red, foi possível observar o aspecto padrão de colágeno intersticial entre as fibras musculares e a disposição destas fibras e congruência nos grupos controle. Quando realizada a lesão neuropática crônica observamos um acúmulo abundante de colágeno intersticial e aspectos fibróticos com a descaracterização das fibras musculares, agora mostradas como atrofia muscular, caracterizada pela diminuição do calibre das fibras musculares. Nos grupos tratados com as terapias isoladas ou associadas, foi possível observar uma diminuição da expressão do colágeno total em porcentagem, redução do colágeno intersticial entre as fibras musculares e aspectos fibróticos.

Nossas quantificações corroboram com nossos resultados visuais, onde foi apresentando um aumento de 203% de colágeno total nos grupos apenas lesados (CCI) e pós-tratamentos específicos pudemos observar uma diminuição desse colágeno total em 62 % para tratados com exercício, 58 % tratados com Fotobiomodulação e 66% tratados com associação.

Nossos resultados corroboram com diversos estudos onde sugerem efeito benéfico da fotobiomodulação [125] e do exercício [15, 56, 105, 126, 127] em diminuir resposta inflamatória e auxiliar na regeneração muscular. Em relação ao colágeno, foi observado no estudo de Shanti et al.,2013 que a combinação do colágeno intra muscular com um agente anti inflamatório auxiliou na diminuição da dor em modelo de CCI [128]. Demonstrando assim, que o colágeno além da contribuição na redução da resposta inflamatória, regeneração muscular, atua também na melhora do quadro algico, mesmo de que indiretamente.

6. CONCLUSÃO

De uma maneira geral, até o momento podemos sugerir, que nosso modelo experimental e capaz de induzir uma neuropatia e que ambos os tratamentos, de forma individual ou associados, são capazes de melhorar o quadro algico em ratos com neuropática periférica. Ainda, nossos resultados demonstram uma melhora no comportamento motor observada nos animais neuropáticos tratados apenas com exercício em meio aquático.

Embora ainda não seja clara na literatura a correlação Pax7/MYOD e como ela funciona, podemos sugerir que essa correlação existe entre ambos, uma vez que sua expressão foi alterada após lesão.

Também é possível mencionar, que o exercício é eficaz na manutenção de massa muscular em modelo de dor neuropática, e que todas as terapias, isoladas ou associadas tem efeitos no controle da inflamação do musculo e do controle do colágeno infiltrado nas células musculares.

Com isso, podemos afirmar que a associação de terapias tem resultados positivos e que podem possivelmente melhorar a qualidade de vida dos pacientes com dor neuropática. Lembrando, que as terapias utilizadas em nosso projeto, são terapias não medicamentosas, sem efeitos colaterais, com baixo custo e com uso clínico. Portanto qualquer melhora, mesmo que seja mínima, para esses pacientes, é de suma importância, pois trazem uma esperança de tratamento ou melhora no quadro doloroso, consecutivamente, melhora na qualidade de vida de muitos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Raja, S.N., et al., *The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises*. Pain, 2020. **161**(9): p. 1976-1982.
2. Kami, K., F. Tajima, and E. Senba, *Exercise-induced hypoalgesia: potential mechanisms in animal models of neuropathic pain*. Anat Sci Int, 2017. **92**(1): p. 79-90.
3. Guo, J.B., et al., *Meta-Analysis of the Effect of Exercise on Neuropathic Pain Induced by Peripheral Nerve Injury in Rat Models*. Front Neurol, 2019. **10**: p. 636.
4. Sah, D.W., M.H. Ossipo, and F. Porreca, *Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(6): p. 460-72.
5. Devor, S.T. and J.A. Faulkner, *Regeneration of new fibers in muscles of old rats reduces contraction-induced injury*. J Appl Physiol (1985), 1999. **87**(2): p. 750-6.
6. Ropper, A.H. and R.D. Zafonte, *Sciatica*. N Engl J Med, 2015. **372**(13): p. 1240-8.
7. Toth, C., J. Lander, and S. Wiebe, *The prevalence and impact of chronic pain with neuropathic pain symptoms in the general population*. Pain Med, 2009. **10**(5): p. 918-29.
8. Moes, J.R. and J.E. Holden, *Characterizing activity and muscle atrophy changes in rats with neuropathic pain: a pilot study*. Biol Res Nurs, 2014. **16**(1): p. 16-22.
9. Smith, B.H., et al., *Health and quality of life associated with chronic pain of predominantly neuropathic origin in the community*. Clin J Pain, 2007. **23**(2): p. 143-9.
10. PACHIONI, C.L.A.S., *RATS' ISCHIATIC NERVE INJURY CAUSED BY SMASHING: A VASCULARIZATION STUDY*. 2006.
11. Decosterd, I. and C.J. Woolf, *Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain*. Pain, 2000. **87**(2): p. 149-58.
12. Bennett, G.J. and Y.K. Xie, *A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man*. Pain, 1988. **33**(1): p. 87-107.
13. Hao, J., X. Zhu, and A. Bensoussan, *Effects of Nonpharmacological Interventions in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: An Overview of Systematic Reviews and Meta-Analyses*. Integr Cancer Ther, 2020. **19**: p. 1534735420945027.
14. Hamid, A.c., *Tratamento conservador. Medicamentoso*. Rev Bras Reumatol, 2008.
15. Palandi, J., et al., *Neuropathic pain after spinal cord injury and physical exercise in animal models: A systematic review and meta-analysis*. Neurosci Biobehav Rev, 2020. **108**: p. 781-795.
16. Rocha, I.R.C., et al., *Photobiostimulation reverses allodynia and peripheral nerve damage in streptozotocin-induced type 1 diabetes*. Lasers Med Sci, 2017. **32**(3): p. 495-501.
17. Santos, F.M., et al., *The neural mobilization technique modulates the expression of endogenous opioids in the periaqueductal gray and improves muscle strength and mobility in rats with neuropathic pain*. Behav Brain Funct, 2014. **10**: p. 19.
18. da Silva, J.T., et al., *Anti-NGF treatment can reduce chronic neuropathic pain by changing peripheral mediators and brain activity in rats*. Behav Pharmacol, 2019. **30**(1): p. 79-88.
19. da Silva, J.T., et al., *Neural mobilization promotes nerve regeneration by nerve growth factor and myelin protein zero increased after sciatic nerve injury*. Growth Factors, 2015. **33**(1): p. 8-13.
20. de Oliveira, M.E., et al., *Effects of photobiomodulation therapy on neuropathic pain in rats: evaluation of nociceptive mediators and infrared thermography*. Lasers Med Sci, 2020.

-
21. Oliveira, M.E., et al., *Low level laser therapy alters satellite glial cell expression and reverses nociceptive behavior in rats with neuropathic pain*. Photochem Photobiol Sci, 2017. **16**(4): p. 547-554.
 22. Correia Rocha, I.R. and M. Chacur, *Modulatory effects of photobiomodulation in the anterior cingulate cortex of diabetic rats*. Photochem Photobiol Sci, 2021. **20**(6): p. 781-790.
 23. Luiz.C.Junqueira, J.C., *Histologia Básica*. Guanabara Koong SA., 2004. **10**.
 24. HALL, G., in *Tratado de Fisiologia médica*, Elsevier, Editor. 2011.
 25. Cardozo, C.P. and Z.A. Graham, *Muscle-bone interactions: movement in the field of mechano-humoral coupling of muscle and bone*. Ann N Y Acad Sci, 2017. **1402**(1): p. 10-17.
 26. TORTORA, *Princípios de anatomia e fisiologia 14ª Edição*.
 27. Rassier, D.E., *Sarcomere mechanics in striated muscles: from molecules to sarcomeres to cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2017. **313**(2): p. C134-C145.
 28. Yang, D., et al., *Proliferation of vascular smooth muscle cells under inflammation is regulated by NF-kappaB p65/microRNA-17/RB pathway activation*. Int J Mol Med, 2018. **41**(1): p. 43-50.
 29. Mukund, K. and S. Subramaniam, *Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2020. **12**(1): p. e1462.
 30. Choe, M.A., et al., *Hindlimb muscle atrophy occurs from peripheral nerve damage in a rat neuropathic pain model*. Biol Res Nurs, 2011. **13**(1): p. 44-54.
 31. Daemen, M.A., et al., *Motor denervation induces altered muscle fibre type densities and atrophy in a rat model of neuropathic pain*. Neurosci Lett, 1998. **247**(2-3): p. 204-8.
 32. Frontera, W.R. and J. Ochala, *Skeletal muscle: a brief review of structure and function*. Calcif Tissue Int, 2015. **96**(3): p. 183-95.
 33. Ganassi, M. and P.S. Zammit, *Involvement of muscle satellite cell dysfunction in neuromuscular disorders: Expanding the portfolio of satellite cell-opathies*. Eur J Transl Myol, 2022. **32**(1).
 34. Bonaldo, P. and M. Sandri, *Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy*. Dis Model Mech, 2013. **6**(1): p. 25-39.
 35. Dayton, P. and M. Feilmeier, *Comparison of Tibial Sesamoid Position on Anteroposterior and Axial Radiographs Before and After Triplane Tarsal Metatarsal Joint Arthrodesis*. J Foot Ankle Surg, 2017. **56**(5): p. 1041-1046.
 36. Zhao, D.D., et al., *[Effect of electroacupuncture on amyotrophy and expression of myogenic differentiation-related genes of gastrocnemius in rats with chronic constriction injury of sciatic nerve]*. Zhen Ci Yan Jiu, 2019. **44**(1): p. 37-42.
 37. Sartorelli, V. and M. Fulco, *Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy*. Sci STKE, 2004. **2004**(244): p. re11.
 38. Wang, Y.X. and M.A. Rudnicki, *Satellite cells, the engines of muscle repair*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **13**(2): p. 127-33.
 39. Dumont, N.A., et al., *Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration*. Compr Physiol, 2015. **5**(3): p. 1027-59.
 40. Wang, R., et al., *Glial cell line-derived neurotrophic factor normalizes neurochemical changes in injured dorsal root ganglion neurons and prevents the expression of experimental neuropathic pain*. Neuroscience, 2003. **121**(3): p. 815-24.
 41. Ferrari, G., et al., *Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors*. Science, 1998. **279**(5356): p. 1528-30.

-
42. Delaney, K., et al., *The role of TGF-beta1 during skeletal muscle regeneration*. Cell Biol Int, 2017. **41**(7): p. 706-715.
 43. Beasi, W.R., et al., *Effects of photobiomodulation and swimming on gene expression in rats with the tibialis anterior muscle injury*. Lasers Med Sci, 2021. **36**(7): p. 1379-1387.
 44. McCarthy, J.J., et al., *Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle*. Development, 2011. **138**(17): p. 3657-66.
 45. Caroll , M., *Muscle atrophy*.
 46. Levy, J.a., *Atrofias Musculares*. Revista de Medicina (USP).
 47. Ito, N., *Molecular Basis of muscle hypertrophy and atrophy: potential therapy for muscular dystrophy*. Jornal of Physical Fitness Sports Medicine, 2013.
 48. Amthor, H., et al., *Muscle hypertrophy driven by myostatin blockade does not require stem/precursor-cell activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(18): p. 7479-84.
 49. Lecker, S.H., A.L. Goldberg, and W.E. Mitch, *Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(7): p. 1807-19.
 50. Lecker, S.H., et al., *Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression*. FASEB J, 2004. **18**(1): p. 39-51.
 51. Bodine, S.C., et al., *Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1704-8.
 52. Jackman, R.W. and S.C. Kandarian, *The molecular basis of skeletal muscle atrophy*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(4): p. C834-43.
 53. Brown, A.K., et al., *Exercise therapy and recovery after SCI: evidence that shows early intervention improves recovery of function*. Spinal Cord, 2011. **49**(5): p. 623-8.
 54. Bertolini, G.R., et al., *Swimming training and functional assessment of sciatic nociception in rats*. Rev Bras Reumatol, 2011. **51**(3): p. 249-59.
 55. Kuphal, K.E., E.E. Fibuch, and B.K. Taylor, *Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents*. J Pain, 2007. **8**(12): p. 989-97.
 56. Farzad, B., et al., *Swimming Training Attenuates Allodynia and Hyperalgesia Induced by Peripheral Nerve Injury in an Adult Male Rat Neuropathic Model: Effects on Irisin and GAD65*. Pain Med, 2018. **19**(11): p. 2236-2245.
 57. Shen, J., L.E. Fox, and J. Cheng, *Swim therapy reduces mechanical allodynia and thermal hyperalgesia induced by chronic constriction nerve injury in rats*. Pain Med, 2013. **14**(4): p. 516-25.
 58. Rostami, Z., et al., *Sex Difference in Trigeminal Neuropathic Pain Response to Exercise: Role of Oxidative Stress*. Pain Res Manag, 2020. **2020**: p. 3939757.
 59. Wegner, M., et al., *Effects of exercise on anxiety and depression disorders: review of meta- analyses and neurobiological mechanisms*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2014. **13**(6): p. 1002-14.
 60. Mattos, F., et al., *Effects of aquatic exercise on muscle strength and functional performance of individuals with osteoarthritis: a systematic review*. Rev Bras Reumatol Engl Ed, 2016. **56**(6): p. 530-542.
 61. Den Heijer, A.E., et al., *Sweat it out? The effects of physical exercise on cognition and behavior in children and adults with ADHD: a systematic literature review*. J Neural Transm (Vienna), 2017. **124**(Suppl 1): p. 3-26.
 62. Stubbs, B., et al., *An examination of the anxiolytic effects of exercise for people with anxiety and stress-related disorders: A meta-analysis*. Psychiatry Res, 2017. **249**: p. 102-108.

-
63. Khan, J., et al., *Response profile in a rat model of exercise-induced hypoalgesia is associated with duloxetine, pregabalin and diclofenac effect on constriction-induced neuropathy*. Eur J Pain, 2022.
 64. Detloff, M.R., et al., *Delayed Exercise Is Ineffective at Reversing Aberrant Nociceptive Afferent Plasticity or Neuropathic Pain After Spinal Cord Injury in Rats*. Neurorehabil Neural Repair, 2016. **30**(7): p. 685-700.
 65. Detloff, M.R., et al., *Acute exercise prevents the development of neuropathic pain and the sprouting of non-peptidergic (GDNF- and artemin-responsive) c-fibers after spinal cord injury*. Exp Neurol, 2014. **255**: p. 38-48.
 66. Nees, T.A., et al., *Early-onset treadmill training reduces mechanical allodynia and modulates calcitonin gene-related peptide fiber density in lamina III/IV in a mouse model of spinal cord contusion injury*. Pain, 2016. **157**(3): p. 687-697.
 67. Sliwinski, M.M., et al., *Community exercise programing and its potential influence on quality of life and functional reach for individuals with spinal cord injury*. J Spinal Cord Med, 2020. **43**(3): p. 358-363.
 68. Dugan, S.A., et al., *Association between physical activity and depressive symptoms: midlife women in SWAN*. Med Sci Sports Exerc, 2015. **47**(2): p. 335-42.
 69. Baxter, G.D., et al., *Low level laser therapy (Photobiomodulation therapy) for breast cancer-related lymphedema: a systematic review*. BMC Cancer, 2017. **17**(1): p. 833.
 70. Zadik, Y., et al., *Systematic review of photobiomodulation for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines*. Support Care Cancer, 2019. **27**(10): p. 3969-3983.
 71. Zecha, J.A., et al., *Low level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 1: mechanisms of action, dosimetric, and safety considerations*. Support Care Cancer, 2016. **24**(6): p. 2781-92.
 72. Suter, V.G.A., S. Sjolund, and M.M. Bornstein, *Effect of laser on pain relief and wound healing of recurrent aphthous stomatitis: a systematic review*. Lasers Med Sci, 2017. **32**(4): p. 953-963.
 73. Machado, A.C., et al., *Is photobiomodulation (PBM) effective for the treatment of dentin hypersensitivity? A systematic review*. Lasers Med Sci, 2018. **33**(4): p. 745-753.
 74. Cronshaw, M., et al., *Systematic Review of Orthodontic Treatment Management with Photobiomodulation Therapy*. Photobiomodul Photomed Laser Surg, 2019. **37**(12): p. 862-868.
 75. Tomazoni, S.S., et al., *Photobiomodulation therapy does not decrease pain and disability in people with non-specific low back pain: a systematic review*. J Physiother, 2020. **66**(3): p. 155-165.
 76. Ezzati, K., R. Fekrazad, and Z. Raoufi, *The Effects of Photobiomodulation Therapy on Post-Surgical Pain*. J Lasers Med Sci, 2019. **10**(2): p. 79-85.
 77. Chow, R.T., et al., *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, 2009. **374**(9705): p. 1897-908.
 78. Huang, Z., et al., *The effectiveness of low-level laser therapy for nonspecific chronic low back pain: a systematic review and meta-analysis*. Arthritis Res Ther, 2015. **17**: p. 360.
 79. Sobral, A.P.T., et al., *Photomodulation in the treatment of chronic pain in patients with temporomandibular disorder: protocol for cost-effectiveness analysis*. BMJ Open, 2018. **8**(5): p. e018326.

-
80. Oliveira, C.G., et al., *Photobiomodulation reduces nociception and edema in a CFA-induced muscle pain model: effects of LLLT and LEDT*. *Photochem Photobiol Sci*, 2020. **19**(10): p. 1392-1401.
 81. de Oliveira, M.E., et al., *Effects of photobiomodulation therapy on neuropathic pain in rats: evaluation of nociceptive mediators and infrared thermography*. *Lasers Med Sci*, 2021. **36**(7): p. 1461-1467.
 82. Pigatto, G.R., et al., *Low-Intensity Photobiomodulation Decreases Neuropathic Pain in Paw Ischemia-Reperfusion and Spared Nervus Ischiadicus Injury Experimental Models*. *Pain Pract*, 2020. **20**(4): p. 371-386.
 83. Ibarra, A.M.C., et al., *Photobiomodulation on trigeminal neuralgia: systematic review*. *Lasers Med Sci*, 2020.
 84. Kobiela Ketz, A., et al., *Characterization of Macrophage/Microglial Activation and Effect of Photobiomodulation in the Spared Nerve Injury Model of Neuropathic Pain*. *Pain Med*, 2017. **18**(5): p. 932-946.
 85. Milares, L.P., et al., *Effectiveness of an aquatic exercise program and low-level laser therapy on articular cartilage in an experimental model of osteoarthritis in rats*. *Connect Tissue Res*, 2016. **57**(5): p. 398-407.
 86. Beasi, W.R., et al., *Effects of photobiomodulation and swimming on gene expression in rats with the tibialis anterior muscle injury*. *Lasers Med Sci*, 2020.
 87. Amadio, E.M., et al., *The action of pre-exercise low-level laser therapy (LLLT) on the expression of IL-6 and TNF-alpha proteins and on the functional fitness of elderly rats subjected to aerobic training*. *Lasers Med Sci*, 2015. **30**(3): p. 1127-34.
 88. Guaraldo, S.A., et al., *The effect of low-level laser therapy on oxidative stress and functional fitness in aged rats subjected to swimming: an aerobic exercise*. *Lasers Med Sci*, 2016. **31**(5): p. 833-40.
 89. Aquino, A.E., Jr., et al., *Can low-level laser therapy when associated to exercise decrease adipocyte area?* *J Photochem Photobiol B*, 2015. **149**: p. 21-6.
 90. Aquino, A.E., Jr., et al., *Low-level laser therapy (LLLT) combined with swimming training improved the lipid profile in rats fed with high-fat diet*. *Lasers Med Sci*, 2013. **28**(5): p. 1271-80.
 91. Zimmermann, M., *Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals*. *Pain*, 1983. **16**(2): p. 109-10.
 92. Abu-Shawareb, H., et al., *Lawson Criterion for Ignition Exceeded in an Inertial Fusion Experiment*. *Phys Rev Lett*, 2022. **129**(7): p. 075001.
 93. Austin, P.J., A. Wu, and G. Moalem-Taylor, *Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats*. *J Vis Exp*, 2012(61).
 94. Randall, L.O. and J.J. Selitto, *A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue*. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1957. **111**(4): p. 409-19.
 95. Tena, B., et al., *Reproducibility of Electronic Von Frey and Von Frey monofilaments testing*. *Clin J Pain*, 2012. **28**(4): p. 318-23.
 96. Hargreaves, K., et al., *A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia*. *Pain*, 1988. **32**(1): p. 77-88.
 97. Xing, H., et al., *TRPM8 mechanism of cold allodynia after chronic nerve injury*. *J Neurosci*, 2007. **27**(50): p. 13680-90.
 98. Yoon, C., et al., *Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain*. *Pain*, 1994. **59**(3): p. 369-376.
 99. Deuis, J.R., L.S. Dvorakova, and I. Vetter, *Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents*. *Front Mol Neurosci*, 2017. **10**: p. 284.

-
100. Bove, S.E., et al., *Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003. **11**(11): p. 821-30.
 101. Kurien, B.T. and R.H. Scofield, *Western blotting*. *Methods*, 2006. **38**(4): p. 283-93.
 102. Liu, Z.Q., T. Mahmood, and P.C. Yang, *Western blot: technique, theory and trouble shooting*. *N Am J Med Sci*, 2014. **6**(3): p. 160.
 103. Cardiff, R.D., C.H. Miller, and R.J. Munn, *Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2014. **2014**(6): p. 655-8.
 104. Cardiff, R.D., C.H. Miller, and R.J. Munn, *Manual immunohistochemistry staining of mouse tissues using the avidin-biotin complex (ABC) technique*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2014. **2014**(6): p. 659-62.
 105. Barbosa, G.K., et al., *Morphological Changes in the Motor Endplate and in the Belly Muscle Induced by Previous Static Stretching to the Climbing Protocol*. *Microsc Microanal*, 2021: p. 1-9.
 106. Bhutda, S., et al., *Histochemical Staining of Collagen and Identification of Its Subtypes by Picrosirius Red Dye in Mouse Reproductive Tissues*. *Bio Protoc*, 2017. **7**(21): p. e2592.
 107. Finnerup, N.B., R. Kuner, and T.S. Jensen, *Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment*. *Physiol Rev*, 2021. **101**(1): p. 259-301.
 108. Colloca, L., et al., *Neuropathic pain*. *Nat Rev Dis Primers*, 2017. **3**: p. 17002.
 109. Szok, D., et al., *Therapeutic Approaches for Peripheral and Central Neuropathic Pain*. *Behav Neurol*, 2019. **2019**: p. 8685954.
 110. Ibarra, A.M.C., et al., *Photobiomodulation on trigeminal neuralgia: systematic review*. *Lasers Med Sci*, 2021. **36**(4): p. 715-722.
 111. Hsieh, Y.L., et al., *Early Intervention of Cold-Water Swimming on Functional Recovery and Spinal Pain Modulation Following Brachial Plexus Avulsion in Rats*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(3).
 112. Micheli, L., et al., *Photobiomodulation therapy by NIR laser in persistent pain: an analytical study in the rat*. *Lasers Med Sci*, 2017. **32**(8): p. 1835-1846.
 113. Cobianchi, S., et al., *Short- but not long-lasting treadmill running reduces allodynia and improves functional recovery after peripheral nerve injury*. *Neuroscience*, 2010. **168**(1): p. 273-87.
 114. Malta, E.S., et al., *Effect of 12 Weeks of Endurance Training Combined with Creatine Supplement, Photobiomodulation Therapy, or Both on Performance and Muscle Damage in Rats*. *Photobiomodul Photomed Laser Surg*, 2020. **38**(12): p. 708-712.
 115. Farazi, N., et al., *Synergistic effects of combined therapy with transcranial photobiomodulation and enriched environment on depressive- and anxiety-like behaviors in a mice model of noise stress*. *Lasers Med Sci*, 2022. **37**(2): p. 1181-1191.
 116. Dutra, Y.M., et al., *Deconstructing the Ergogenic Effects of Photobiomodulation: A Systematic Review and Meta-analysis of its Efficacy in Improving Mode-Specific Exercise Performance in Humans*. *Sports Med*, 2022. **52**(11): p. 2733-2757.
 117. Zammit, P.S., et al., *Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 9): p. 1824-32.
 118. Hyatt, J.P., et al., *PAX3/7 expression coincides with MyoD during chronic skeletal muscle overload*. *Muscle Nerve*, 2008. **38**(1): p. 861-6.
 119. Tian, Z.L., et al., *Detection of satellite cells during skeletal muscle wound healing in rats: time-dependent expressions of Pax7 and MyoD in relation to wound age*. *Int J Legal Med*, 2016. **130**(1): p. 163-72.

-
120. Yagi, M., et al., *Dissecting dual roles of MyoD during lineage conversion to mature myocytes and myogenic stem cells*. Genes Dev, 2021. **35**(17-18): p. 1209-1228.
 121. Roberts, L.A., et al., *Post-exercise cold water immersion attenuates acute anabolic signalling and long-term adaptations in muscle to strength training*. J Physiol, 2015. **593**(18): p. 4285-301.
 122. Fujimaki, S., et al., *Treadmill running induces satellite cell activation in diabetic mice*. Biochem Biophys Rep, 2016. **8**: p. 6-13.
 123. Roman, W., et al., *Muscle repair after physiological damage relies on nuclear migration for cellular reconstruction*. Science, 2021. **374**(6565): p. 355-359.
 124. Azhar, M., B.W.K. Wardhani, and E. Renesteen, *The regenerative potential of Pax3/Pax7 on skeletal muscle injury*. J Genet Eng Biotechnol, 2022. **20**(1): p. 143.
 125. Garcia, T.A., et al., *Histological analysis of the association of low level laser therapy and platelet-rich plasma in regeneration of muscle injury in rats*. Braz J Phys Ther, 2017. **21**(6): p. 425-433.
 126. Hardy, D., et al., *Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0147198.
 127. Rocha, L.C., et al., *Remodeling of the skeletal muscle and postsynaptic component after short-term joint immobilization and aquatic training*. Histochem Cell Biol, 2020. **154**(6): p. 621-628.
 128. Shanti, R.M., et al., *Is there a role for a collagen conduit and anti-inflammatory agent in the management of partial peripheral nerve injuries?* J Oral Maxillofac Surg, 2013. **71**(6): p. 1119-25.