

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO

TAMIRIS DA SILVA

**OS EFEITOS DA TERAPIA COM FOTOBIMODULAÇÃO SISTÊMICA EM
INDIVÍDUOS COM ESCLEROSE MÚLTIPLA REMITENTE RECORRENTE –
ESTUDO CLÍNICO, RANDOMIZADO**

São Paulo, SP

2018

TAMIRIS DA SILVA

**OS EFEITOS DA TERAPIA COM FOTOBIMODULAÇÃO SISTÊMICA EM
INDIVÍDUOS COM ESCLEROSE MÚLTIPLA REMITENTE RECORRENTE –
ESTUDO CLÍNICO, RANDOMIZADO**

Dissertação apresentada à Universidade
Nove de Julho para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Reabilitação

Orientador: Prof. Dra. Sandra Kalil Bussadori

São Paulo, SP

2018

Silva, Tamiris da.

Os efeitos da terapia com fotobiomodulação sistêmica em indivíduos com esclerose múltipla remitente recorrente – estudo clínico randomizado. / Tamiris da Silva. 2018.

60 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2018.

Orientador (a): Profª. Drª. Sandra Kalil Bussadori.

1. Esclerose múltipla. 2. Estresse oxidativo. 3. Mediadores inflamatórios. 4. Modalidades de fisioterapia. 5. Photobiomodulation.

I. Bussadori, Sandra Kalil. II. Título

CDU 615.8

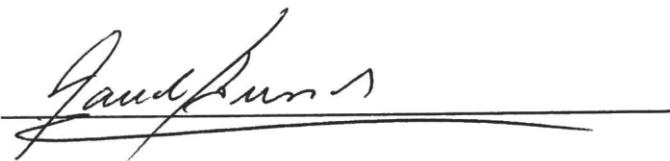
São Paulo, 19 de dezembro de 2018.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): Tamiris da Silva

Título da Dissertação: "Avaliação da Inflamação e Estresse Nitrosativo em Indivíduos com Esclerose Múltipla Remitente Recorrente Após Terapia com Fotobiomodulação- Ensaio Clínico, Randomizado e Cego".

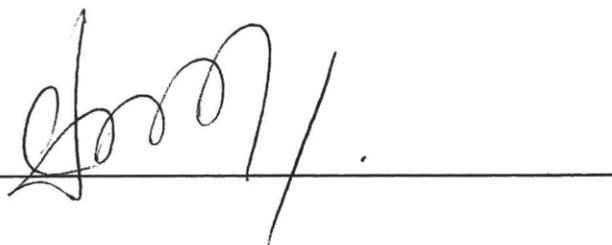
Presidente: PROFA. DRA. SANDRA KALIL BUSSADORI



Membro: PROFA. DRA. DANIELA DE FÁTIMA TEIXEIRA DA SILVA



Membro: PROFA. DRA. YARA DADALTI FRAGOSO



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente ao meu amado Jesus... Ele tem direcionado a minha vida, e vem sendo a minha principal motivação em buscar conhecimento para que eu possa ajudar o próximo. Me sinto abençoada por cada momento que Deus me proporcionou durante todo este estudo.

Aos meus amados pais Maria Luiza e Joaquim, agradeço do fundo meu coração por todo incentivo. Sem vocês nada seria possível, sinto-me grata pois vocês sempre me incentivaram a estudar, a ser uma pessoa melhor, me proporcionando tudo que nem mesmo vocês tiveram. Eu amo vocês!

Ao meu querido namorado Cassiano, agradeço por todo apoio, paciência, ouvir minhas aflições, secar as minhas lágrimas e por suas palavras de ânimo, e seu amor nos momentos em que mais precisei. Te amo

À minha querida orientadora Profa. Dra. Sandra Kalil Bussadori, agradeço por tê-la conhecido e pelo privilégio em ser sua aluna. Eu a admiro por ser essa pessoa linda, sempre sorrindo, possui um coração enorme, humilde, sempre disposta a ajudar o próximo. Não tenho palavras que possam descrever a infinita gratidão por todo aprendizado, puxões de orelha, por seu incentivo, e principalmente por seu exemplo como pesquisadora. Que possamos juntas realizar muitos trabalhos em benefícios de nossos pacientes. Obrigada por ser essa orientadora incrível!

À Profa. Dra. Yara Dadalti Fragoso, a melhor neurologista que já conheci! Agradeço por compartilhar seus conhecimentos, como eu cresci profissionalmente em pouco tempo ao seu lado. Ainda fico impressionada com tanto conhecimento, principalmente ao vê-la avaliando os exames de RM de seus pacientes. A senhora tem sido fonte de inspiração para continuar pesquisando tratamentos promissores na EM. Abençoados são os alunos, pesquisadores e pacientes que cruzarem seus caminhos! Que abençoada eu fui!

À Profa. Dra. Maria Fernanda, agradeço por sua paciência em me ensinar todos os experimentos que realizei neste trabalho. Com toda certeza a senhora é a melhor! Você transformou o que era impossível para mim (Fazer ELISA), em algo possível.
Muito Obrigada!

Aos meus queridos pacientes, agradeço pela confiança, disponibilidade, e principalmente por todo os momentos felizes que passamos juntos! O versículo que nos define é: Ameis uns aos outros (Jo13:34), pois juntos somos mais fortes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha querida amiga Fernanda Cordeiro, juntas nós temos as melhores ideias, discussões científicas. Juntas nós vamos muito longe!

Às minhas Best'nhas, Thalita de Paula, Daysi Tobelem, Aline Novello, Fernanda Cordeiro, obrigada do fundo do meu coração por toda ajuda, incentivo e principalmente pelos cafés. Amo vocês.

Agradeço as minhas companheiras de laboratório Kaline, Mônica, Solange, Andréia e aos técnicos do laboratório. Praticamente nós moramos no laboratório, e eu só tenho de agradecer por todos os momentos compartilhados que estivemos juntas. Serei infinitamente grata a vocês.

À minha amiga Ariane Viana, lembro que nas coletas de amostras sangue eu realmente não sabia por onde começar, e você me deu a luz! Obrigada amiga por tudo que fez.

Agradeço a Prof^a. Dra.Kátia De Angelis por disponibilizar seu laboratório na UNIFESP para realizar a avaliação do nitrito.

Agradeço a Prof^o Dr. Dirceu Costa por disponibilizar o LARESP para atendimento das pacientes no período de férias da clínica de fisioterapia da UNINOVE.

Aos professores do laboratório da pós-graduação, todos sem exceção são profissionais extraordinários, são minha inspiração, e posso dizer que através da aula de cada um de vocês este projeto foi nascendo. Obrigada por compartilharem todo conhecimento.

Aos alunos de Iniciação Científica por toda ajuda e interesse científico! É sempre muito bom estar com vocês!

A UNINOVE pela oportunidade de aprendizado desde minha graduação! Muito obrigada pelo apoio a nossa pesquisa!

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa (1806473) que foi concedida em meu período de mestrado.

Serei eternamente grata!

RESUMO

A esclerose múltipla é uma doença autoimune do sistema nervoso central. A inflamação e o estresse oxidativo contribuem para a destruição da bainha de mielina e conseqüentemente bloqueio ou desaceleração dos impulsos nervosos causando múltiplos sintomas. A fotobiomodulação é uma terapia não farmacológica utilizada para outras condições inflamatórias crônicas e pode ter um papel no tratamento da esclerose múltipla. **Objetivo:** Analisar IL-6, IL-10 e estresse nitrosativo após o tratamento com fotobiomodulação sistêmica em pacientes com esclerose múltipla remitente recorrente. **Métodos:** 34 participantes foram recrutados no ambulatório da UNINOVE. Os níveis de nitrito foram analisados através do ensaio de Griess, as IL-6 e IL-10 foram analisadas pelo ELISA. Os indivíduos foram randomizados e alocados nos grupos, sendo grupo (1) terapia com fotobiomodulação sublingual, Grupo (2) terapia com fotobiomodulação na artéria radial, grupo (3) Controle de indivíduos saudáveis, grupo (4) controle de indivíduos com esclerose múltipla. **Resultados:** Foram observados redução significativa do nitrito após o tratamento no grupo 1 ($p < 0,01$), e não houve diminuição no grupo 2 ($p > 0,05$). Na análise da IL-10 os resultados mostram que houve aumento significativo nos grupos 1 e 2 ($p < 0,01$). Não houve mudanças significativas da IL-6 após o tratamento ($p > 0,05$). Além disso houve redução nos scores da escala modificada da fadiga no grupo 1 ($p < 0,01$), já no grupo 2 não apresentou resultados significantes ($p > 0,05$). **Conclusão:** O tratamento com FBM em direção a a. radial não mostrou diminuição nos níveis de nitritos e fadiga, porém conseguiu modular de forma positiva a expressão da IL-10. Já o tratamento com FBM sublingual mostrou-se eficaz em reduzir os níveis de nitrito e aumentar a expressão da IL-10 além de melhorar a fadiga. O tamanho e a homogeneidade da amostra podem ser uma ressalva a essas afirmativas.

Palavras-chave: Esclerose múltipla, Estresse oxidativo, Mediadores inflamatórios, Modalidades de fisioterapia, fotobiomodulação

ABSTRACT

Multiple sclerosis is an autoimmune disease of the central nervous system. Inflammation and oxidative stress contribute to the destruction of the brain and consequent blockage or deceleration of nerve impulses and painful symptoms. Photobiomodulation is a non-pharmacological therapy for people with chronic conditions and may have an untreated role for multiple sclerosis. **Objective:** To analyze IL-6, IL-10 and nitrosative stress after treatment with systemic photobiomodulation in patients with recurrent relapsing multiple sclerosis. **Methods:** 34 participants were recruited at the UNINOVE clinic. Nitrite levels were analyzed by the Griess assay, IL-6 and IL-10 were analyzed by the ELISA. The individuals were randomized and allocated to the groups, being group (1) sublingual photobiomodulation therapy, group (2) photobiomodulation therapy in the radial artery, group (3) Control of healthy individuals, group (4) control individuals with multiple sclerosis. **Results:** Significant nitrite reduction after treatment in group 1 ($p < 0.01$) was observed, and there was no decrease in group 2 ($p > 0.05$). In the IL-10 analysis the results show that there was a significant increase in groups 1 and 2 ($p < 0.01$). There were no significant changes in IL-6 after treatment ($p > 0.05$). In addition, there was a reduction in scores on the modified scale of fatigue in group 1 ($p < 0.01$), whereas in group 2 there were no significant results ($p > 0.05$). **Conclusion:** Treatment with FBM towards a radial expression did not show a decrease in nitrite and fatigue levels, but it was able to positively modulate IL-10 expression. Treatment with sublingual FBM has been shown to be effective in reducing nitrite levels and increasing IL-10 expression, in addition to improving fatigue. The size and homogeneity of the sample may be a qualification to these assertions.

Keywords: Multiple sclerosis, oxidative stress, Inflammation Mediators, Physical Therapy Modalities, photobiomodulation

SUMÁRIO

1. Contextualização	12
1.1. Esclerose Múltipla.....	12
1.2. Inflamação na esclerose múltipla.....	13
1.3. Estresse oxidativo na esclerose múltipla	14
1.4. Fotobiomodulação	15
1.5. Efeito sistêmico da fotobiomodulação.....	17
1.6. Justificativa	18
2. Objetivos	19
2.1. Geral.....	19
2.2. Específicos	19
3. Métodos	20
3.1. Casuística.....	20
3.2. Delineamento do estudo.....	21
3.3. Participantes.....	21
3.5. Cálculo amostral.....	23
3.6. Coleta de sangue	23
3.7. Avaliações	24
3.7.1. Expressão proteica das IL -10 e I6	24
3.7.2. Avaliação do nitrito	24
3.7.3. Escala Modificada do Impacto da Fadiga (EMIF)	24
3.8. Protocolo da fotobiomodulação.....	25
3.9. Protocolo dos exercícios de fisioterapia.....	28
3.10. Análise estatística.....	28
4. Resultados.....	29
4.1. Expressão proteica da IL-10.....	29
4.2. Expressão proteica da IL-6.....	30
4.3. Níveis de Nitrito	31
4.4. Escala modificada do impacto da fadiga (EMIF)	33
5. Discussão	34
6. Considerações Finais	38
7. Referências	39
8. Apêndice	43
8.1. Artigo publicado na forma de Protocolo na revista Medicine.....	43
Fator de impacto 2.02	43

8.2. Artigo que será submetido no Multiple Sclerosis Journal	47
Fator de impacto: 5.280	47
9. Anexos	53
Anexo 1	53
Anexo 2	56
Anexo 3	58
Anexo 4	59

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 – Caracterização da amostra	21
Tabela 2 – Parâmetros da fotobiomodulação	27
Quadro 1 – Resumo dos parâmetros dosimétricos	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma CONSORT 2010.....	22
Figura 2 – Calculo amostral	23
Figura 3 – Local da aplicação da fotobiomodulação sublingual.....	26
Figura 4 – Local da aplicação da fotobiomodulação na a. radial.....	26
Figura 5 – Posicionamento do paciente.....	27
Figura 6 – Equipamento para aferir a potência do laser.....	27
Figura 7 – Comparação da expressão da IL-10 pré tratamento	29
Figura 8 - Comparação da expressão da IL-10 pós tratamento	29
Figura 9 – Comparação entre grupos da expressão da IL-10 pós tratamento.....	30
Figura 10– comparação da expressão da IL-6 pré tratamento.....	31
Figura 11 – Comparação da expressão da IL-6 pós tratamento.....	31
Figura 12 – Comparação dos níveis de nitrito entre grupos pré tratamento.....	32
Figura 13 – Comparação dos níveis de nitrito pós tratamento.....	32
Figura 14– Comparação dos escores da EMIF pré e pós o tratamento.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

SNC – Sistema nervoso central

EM – Esclerose múltipla

EMRR – Esclerose múltipla remitente recorrente

TNF – α – fator de necrose tumoral alfa

INF- γ – Intérferon gama

IL – Interleucina

CAA – Células apresentadoras de antígenos

RCT – Receptores de células T

BHE – Barreira hematoencefálica

ERO – Espécie reativa de oxigênio

ERN – Espécie reativa de nitrogênio

ONS – Óxido nitrito síntase

FBM – Fotobiomodulação

nm – Nanômetros

IV – Infravermelho

EAE – Encefalomielite autoimune experimental

CCO – Citocromo – C - Oxidase

ATP – Trifosfato de adenosina

ILIB – Irradiação intravenosa do laser

1. Contextualização

1.1. Esclerose Múltipla

O sistema nervoso central (SNC) pode ser acometido por inúmeras afecções, dentre elas destaca-se a esclerose múltipla (EM), sendo esta uma doença autoimune classificada como a segunda causa mais comum de incapacidade física principalmente em indivíduos jovens¹.

A EM caracteriza-se pela formação de focos inflamatórios localizados, causando morte de oligodendrócitos e desmielinização². Os neurônios são células especializadas, cuja a principal função é a intercomunicação. A bainha de mielina envolve os axônios aumentando a velocidade de condução do impulso nervoso. Com a desmielinização e ocorre a redução do impulso nervoso, causando múltiplos sintomas, incluindo distúrbios visuais, espasticidade, fraqueza muscular, fadiga, comprometimento na marcha, dificuldade de coordenação, tremores/ataxia, dor neuropática, déficits cognitivos, sensoriais, bexiga, alterações emocionais, entre outros³.

A fadiga afeta até 90% dos indivíduos com EM e pode prejudicar significativamente a função, a qualidade de vida e a interação com a família e os amigos. É um sintoma desafiador descrito pelos pacientes como “mal-estar”, “cansaço excessivo” ou “fraqueza” que parece piorar ao longo do dia, bem como em ambientes quentes e úmidos¹.

Embora a causa exata da EM ainda seja desconhecida é considerada uma doença multifatorial complexa que envolve fatores genéticos e ambientais, sendo o principal papel patogênico é atribuído ao sistema imunológico⁴.

Clinicamente a EM é classificada em três tipos: EM primariamente progressiva, secundária progressiva e remitente recorrente (EMRR). A EMRR é caracterizada por surtos, ou seja, a bainha de mielina é danificada o que resulta em um episódio sintomático, porém os oligodendrócitos produzem novamente a mielina resultando recuperação dos sintomas de forma total ou parcial. As outras formas de apresentação da doença são caracterizadas por perda progressiva da função neurológica, com acúmulo de incapacidades⁶.

O prognóstico da doença é variável, sendo que alguns pacientes desenvolvem pouca incapacidade funcional, mesmo após muitos anos de

diagnóstico. Outros pacientes têm um curso rapidamente progressivo com incapacidade significativa desde o início da doença. Essa variedade implica no manejo da EM, porque o curso doença não pode ser previsto no momento do diagnóstico ou apresentação⁷.

A mensuração da incapacidade funcional se faz indispensável no acompanhamento do curso e tratamento da doença. A Expanded Disability Status Scale (EDSS) ou Escala de Incapacidade Funcional Expandida, é o método padrão-ouro para quantificar a incapacidade na esclerose múltipla. é baseada em uma avaliação neurológica dos sistemas funcionais, sendo eles, função piramidal, cerebelar, do tronco encefálico, sensitivas, vesicais, visuais, mentais, locomoção, sendo que a pontuação varia de meio até 10 pontos (Anexo 3)^{27,32}.

O diagnóstico é feito por meio da combinação da história clínica, exame neurológico, ressonância magnética e líquido cefalorraquidiano⁸.

O tratamento realizado com fármacos é capaz de promover o equilíbrio de citocinas pró e anti-inflamatórias. A reabilitação demonstra melhorias na marcha, cognição, fadiga, depressão, qualidade de vida, força muscular e participação nas atividades diárias. A associação dessas terapias beneficia o paciente.^{9,10}.

1.2. Inflamação na esclerose múltipla

O sistema imunológico é constituído por células que possuem o papel de defender o organismo contra agentes estranhos, dentre elas destacam-se os linfócitos T. São componentes do sistema imune adaptativo, desempenhando um papel central na patogênese da EM. As células T podem ser classificadas de acordo com a função desempenhada, destacando-se os linfócitos T auxiliares ou T-helper- Th e os Linfócitos T citotóxicos¹². As células Th podem ser divididas em 2 subtipos baseados nos padrões característicos da secreção das citocinas e suas funções. As células Th1 liberam citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (INF- γ), por exemplo, estas citocinas se associam com progressão da doença e agravamento dos sintomas apresentados. Em contraste, as células Th2 estão associadas a redução da inflamação e liberam interleucinas (IL)- 4, 5 e 10¹³.

Na EM as células T são ativadas no compartimento periférico por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II, que são células apresentadoras de antígenos (CAA) profissionais¹³. Essas células apresentam antígenos específicos da proteína da mielina para os receptores de célula T (RCT), que inclui a proteína básica de mielina, glicoproteína associada à mielina e a glicoproteína oligodendrocitária de mielina¹⁴.

Posteriormente a apresentação do antígeno, inicia-se o processo de migração da célula Th1 para o SNC. As moléculas envolvidas nesta fase são: interinas, quimiocinas, selectinas e metalo-proteínas de matriz⁷. As células T utilizam moléculas de adesão celular e proteases para aderir e migrar através da camada de células endoteliais da barreira hematoencefálica (BHE), e acessam o SNC⁵.

Ao entrar no SNC, as células Th1 liberam uma série de citocinas pró-inflamatórias, tais como, IL-6 INF- γ , e TNF- α , que levam a ativação da micróglia¹¹. As micróglia são residentes no SNC, em seu fenótipo M2 realizam uma variedade de tarefas, que incluem manutenção celular, liberação de fatores tróficos e anti-inflamatórios que facilitam a migração de células para o local de inflamação, já em seu fenótipo tipo M1, possuem capacidades semelhantes aos macrófagos, incluindo fagocitose e produção de citocinas inflamatórias^{12,31}.

Após a ativação de seu fenótipo M1 a micróglia destrói a bainha de mielina e axônios, ou seja, ocorre desmielinização e diminuição do impulso nervoso. Quando ocorre a formação de placas desmielinizadas, a micróglia libera moléculas pró-inflamatórias como o óxido nítrico e seus metabólitos, por exemplo o nitrito, causando danos secundários aos neurônios^{5,15}.

1.3. Estresse oxidativo na esclerose múltipla

O SNC possui vários subconjuntos de macrófagos, como a micróglia que luta para manter a homeostase do SNC. Eles realizam essa tarefa coordenando a poda sináptica, promovendo neurogênese, impedindo que patógenos entrem no SNC. A micróglia representa uma fonte importante de radicais livres, ou seja, liberam espécie reativa de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), havendo desequilíbrio entre essas espécies, caracteriza-se o estresse oxidativo¹⁶.

O óxido nítrico é uma ERN produzido por uma família de óxido nítrico sintases (ONS), que inclui a ONS neuronal, endotelial e induzível, cujas atividades são complexas e abrangentes¹².

Possuem efeito protetor, como por exemplo, crescimento e maturação de oligodendrócitos, combatem infecções no SNC, limpam tecidos danificados, regulam a entrega de oxigênio nos tecidos, regulando a combinação e libertação de oxigênio da hemoglobina, controla o metabolismo mitocondrial. Por outro lado, também possuem efeitos neurodestrutivo quando liberados em altas concentrações, como por exemplo, estimulam a resposta inflamatória, aumentam a permeabilidade da BHE, provocam apoptose neural, induz disfunção mitocondrial, pois diminuem o metabolismo energético das células neurais e conseqüentemente acelera a morte dos oligodendrócitos^{17,18}.

O óxido nítrico causa a disfunção mitocondrial neuronal em três aspectos, a saber, dano no DNA da mitocôndria, inibição dos complexos da cadeia respiratória e apoptose dos neurônios¹⁹.

As mitocôndrias fornecem 90% da energia celular, portanto podem ser consideradas como a força motriz da célula. Sua capacidade de se dividir e migrar facilita a transmissão de energia a longas distâncias, sendo assim ajuda os neurônios atender as altas demandas de energia principalmente nas sinapses. A disfunção mitocondrial é um fator chave que leva a neurodegeneração, causada por descompensação e insuficiência energética, pois o dano da mielina leva ao aumento da necessidade de energia, acelerando a morte dos oligodendrócitos, que são células produtoras de mielina, sendo assim, considera-se um fator importante na progressão da EM, pois impede a remielinização causando sequelas irreversíveis nos pacientes¹⁹.

1.4. Fotobiomodulação

A fotobiomodulação (FBM) é uma fonte de luz em baixa intensidade, que é capaz de bioestimular ou bioinibir processos celulares. Tem sido utilizada para uma variedade de tratamentos, pois penetra profundamente nos tecidos. Para estimular uma resposta biológica é utilizado laser em baixa intensidade em comprimentos de onda de 632-1064 nanômetros (nm). Esses lasers não emitem

calor, som ou vibração. Em vez de gerar um efeito térmico, atua induzindo uma reação fotoquímica na célula, um processo denominado bioestimulação ou fotobiomodulação e apresenta vantagens clínicas mais claras nos comprimentos de onda de 600 – 700 nm que corresponde a luz vermelha (V), e 770 – 1200 nm que corresponde a luz infravermelha (IV)^{20, 21}.

Os estudos relatam que a luz pode afetar o crescimento e o metabolismo desde microrganismos unicelulares simples até mamíferos multicelulares, e possui uma variedade de efeitos terapêuticos, como facilitar a cicatrização de feridas, promover regeneração muscular, evitar os efeitos neurotóxicos²².

A terapia por FBM no SNC também vem sendo investigada, e mostrou resultados positivos nos modelos experimentais da doença de Alzheimer, acidente vascular encefálico, traumatismo crânio encefálico, lesão medular e doença de Parkinson. A FBM também foi estudada na encefalomielite autoimune (EAE), que é o modelo animal que mimetiza a EM. Estudos mostram que, o tratamento com FBM reduziu significativamente a infiltração de células inflamatórias e a área de desmielinização no SNC, atenuou a produção de citocinas pró-inflamatórias durante a patologia da EAE, reduziu o estresse oxidativo, restaurou transporte axonal provocado pela disfunção mitocondrial, aumentou a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e induziu neuroproteção^{3,24-25}.

Os mecanismos celulares da ação da luz IV ainda não são bem compreendidos. Sabe-se que este comprimento de onda estimula o metabolismo celular energético. A FBM trabalha com o princípio de que, quando a luz atinge certas moléculas chamadas cromóforos, que são fotorreceptores, sendo que a membrana da mitocondrial atua como um cromóforo importante na absorção da luz IV^{22,23}.

Os efeitos da FBM na morte neural, indicam que a luz IV pode proteger as células neuronais da morte celular, além disso também descobriram que o CCO é capaz de reduzir os níveis de nitrito, pois aumenta a oxigenação nas células endoteliais de humanos, visto que já foi comprovado que o nitrito inibe a respiração mitocondrial e ao aumentar a atividade de citocromo C oxidase (CCO) e restaura o consumo de oxigênio².

1.5. Efeito sistêmico da fotobiomodulação

De acordo com a literatura, a fotobiomodulação pode produzir efeitos em outras regiões do corpo, além do local onde a irradiação foi realizada. O fato de as células no tecido produzirem substâncias que se espalham e circulam nos vasos sanguíneos e no sistema linfático é uma possível explicação para o efeito sistêmico²⁶. Um dos principais mecanismos do efeito sistêmico da FBM consiste nas mudanças rápidas das células na circulação sanguínea. Um estudo clínico mostrou resultados positivos da aplicação transcutânea da luz na região sacral simultaneamente em amostras de sangue, mostraram diminuição das citocinas pró-inflamatórias, e aumentou as citocinas anti-inflamatórias. Essas alterações aconteceram como resultado da FBM transcutânea que induziu alterações na circulação sanguínea²⁷.

A irradiação intravascular do laser (ILIB) ainda está em fase de prova de conceito. No entanto, há um número crescente de potenciais aplicações clínicas em vários processos patológicos, como tratamento da dor, reparo tecidual, e tratamento cardiovascular. Como o ILBI tem influência sobre todo o organismo, pode ser uma modalidade terapêutica adequada em doenças complexas, como a EM²⁸.

A Rússia foi pioneira nos estudos com ILIB, definindo que a irradiação seja realizada no sangue através de uma agulha intravenosa ou radiação venosa transcutânea²⁷. Os comprimentos de onda usados mais comuns incluem 630, 650, 808, 890 nm. De acordo com os estudos russos, o ILBI aumenta o conteúdo de oxigênio e reduz pressão de dióxido de carbono, elimina a hipóxia tecidual, estimula a oxigenação, reduz o conteúdo da proteína C reativa, aumenta a atividade do complemento, aumenta o nível plasmático das imunoglobulinas, e aumenta a circulação periférica, e parece modular a produção ATP^{27,28, 29}.

O ILIB também foi usado na região sublingual de pacientes com diagnóstico de artrite reumatoide juvenil, o estudo foi justificado pela circulação sanguínea ser muito abundante na região sublingual, de modo que a FBM nessa área poderia trazer grandes benefícios, sendo não invasiva e indolor³⁰.

1.6. Justificativa

Embora o desequilíbrio de citocinas pró e anti-inflamatórias e estresse oxidativo possam ser alterado com tratamentos farmacológicos, estudos de Gonçalves et al. 2016, Muili et al. 2012, 2013, e Lenden et al. 2013 demonstram que a fotobiomodulação local pode modular a inflamação e estresse oxidativo e consequentemente preservar a função mitocondrial, prevenindo a morte dos oligodendrócitos. Sendo assim a FBM poderia complementar o tratamento na esclerose múltipla, porém os efeitos sistêmicos da FBM não foram estudados nessa população.

2. Objetivos

2.1. Geral

Analisar as interleucinas IL-6, IL-10 e estresse oxidativo após o tratamento com fotobiomodulação sistêmica em pacientes EMRR.

2.2. Específicos

- Estabelecer um protocolo de terapia com fotobiomodulação.
- Analisar o efeito sistêmico da fotobiomodulação.
- Analisar a fadiga percebida através da escala modificada da fadiga.
- Comparar os efeitos terapia por fotobiomodulação na região sublingual e artéria radial nos parâmetros de inflamação e estresse oxidativo.
- Estabelecer uma nova abordagem para complementar o tratamento da EM.

3. Métodos

Este estudo trata-se de um estudo clínico, controlado e randomizado, desenvolvido no ambulatório integrado de saúde da Universidade Nove de Julho (UNINOVE). Seguiu as normas regulamentadoras (resolução número 466/2012) de pesquisa em seres humanos com submissão e aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Nove de Julho (Número do Parecer: 2.423.755). Os participantes ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para autorização da participação na pesquisa (Anexo 1). O protocolo deste estudo foi registrado na Clinical Trials (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03360487).

3.1. Casuística

Os participantes foram recrutados no ambulatório integrado de saúde da UNINOVE, segundo critérios de inclusão e exclusão relacionados abaixo.

Crítérios de Inclusão:

- Esclerose múltipla remitente recorrente
- Homens e mulheres
- Idade: 18 a 60 anos
- Estar sob tratamento farmacológico
- Capaz de compreender responder estímulos verbais
- EDSS até 6

Crítérios de Exclusão:

- Possuir outras doenças autoimunes
- Neoplasias
- Insuficiência cardíaca, respiratória, renal ou hepática
- Síndrome da imunodeficiência adquirida
- Gestantes

3.2. Delineamento do estudo

A triagem foi realizada por meio do contato telefônico de pacientes que se encontravam em tratamento e na lista de espera no ambulatório da UNINOVE. Os participantes que se enquadravam nos critérios de inclusão passaram por avaliação fisioterapêutica e médica onde foi preenchida a avaliação inicial (Anexo 2). As incapacidades físicas dos participantes foram avaliadas através da EDSS (Anexo 3) e escala modificada do impacto a fadiga (EMIF). Realizaram coleta de sangue, foram randomizados e alocados nos grupos. (Fluxograma 1)

3.3. Participantes

Os indivíduos com EM recrutados foram randomizados e alocados, em quatro grupos. Grupo (1) FBM na região sublingual (n=8), Grupo (2) FBM na região da a. radial (n=7). Doze pacientes foram pareados para os grupos controles, sendo o grupo (3) Controle de indivíduos saudáveis (n=8) e Grupo (4) pacientes recrutados na Universidade Metropolitana de Santos (UNIMES) e não receberam tratamento com FBM (n=11). Os pacientes pareados para os grupos controle realizaram 2 coletas de sangue em 12 semanas.

É importante ressaltar que os participantes com diagnóstico de EM não foram privados de nenhuma medicação para o tratamento de sua condição base. Após um mês de tratamento os participantes foram submetidos a reavaliação.

Tabela 1. Caracterização da amostra

	<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>	<i>Grupo 3</i>	<i>Grupo 4</i>
Nº Participantes	8	7	8	8
Idade	39,0 ± 6,3	35,1 ± 8,1	34,6 ± 5,5	34,6 ± 5,5
EDSS	3,3 ± 2,1	2,6 ± 1,9	-	-
Sexo (F/M)	7/1	6/1	8/1	8/1
Nº de sessões	24	24	-	-



CONSORT 2010 FI

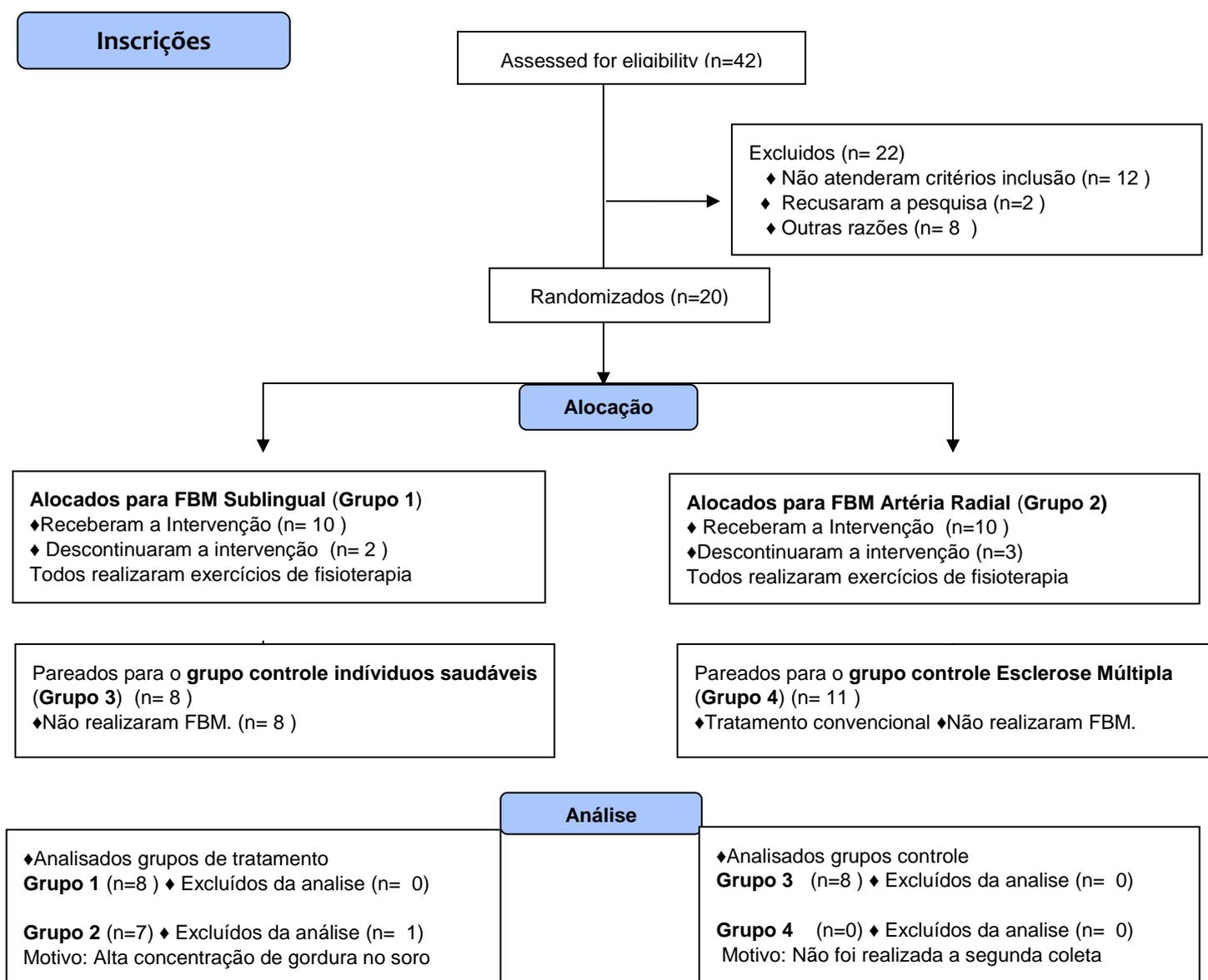


Figura 1. Fluxograma CONSORT 2010

3.4. AVALIAÇÕES

3.5. Cálculo amostral

O tamanho da amostra foi calculado a partir de um estudo piloto e assegura confiabilidade do teste de 95%, o resultado foi de 34 indivíduos divididos em 3 grupos e um tamanho de efeito de 0,8, o poder de teste é de 0,9566, mantendo o nível significativo em $\alpha = 0,05$ (figura 2).

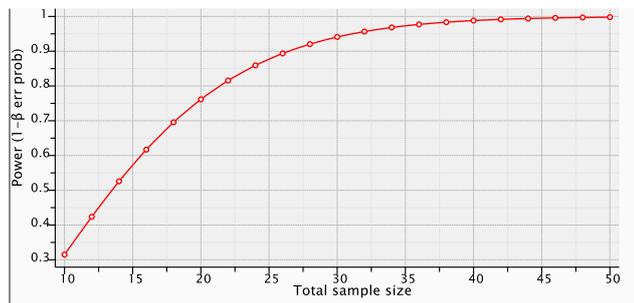


Figura 2. Gráfico cálculo amostral

3.6. Coleta de sangue

Foram coletados 10 mL de sangue da veia cubital média dos participantes. Foi realizada a centrifugação por 10 minutos numa velocidade de 2,800 rotações por minutos (rpm). Foram retiradas as camadas de soro com alíquotas de 300 microlitros (μL) por eppendorfs de cada paciente e armazenado a $- 80^\circ \text{C}$ antes do uso.

3.7. Avaliações

3.7.1. Expressão proteica das IL -10 e I6

As citocinas IL-10 e IL-6 foram quantificadas a partir das amostras de soro dos indivíduos utilizando kits ELISA MAX HUMAN da BioLegend, que contém anticorpos de captura e detecção para quantificação precisa de cada citocina. Todos os kits de avaliação de acordo com as instruções do fabricante. A densidade óptica das amostras foi medida no espectrofotômetro a 450 nm.

3.7.2. Avaliação do nitrito

O nitrito foi determinado nas amostras de soro utilizando a reação de Griess. As amostras foram incubadas com reagente Griess em temperatura ambiente durante 10 minutos e a densidade óptica foi medida com espectrofotômetro a 450 nm.

3.7.3. Escala Modificada do Impacto da Fadiga (EMIF)

A EMIF avalia o impacto da fadiga na vida física, mental e psicossocial dos pacientes. Os participantes classificaram cada item de 0 pontos (sem problemas) a 4 pontos (problema extremo). O paciente foi solicitado a avaliar sua percepção de fadiga no último mês. O total de pontuação é de 0 a 84 pontos. Os domínios da condição física são classificados de 0 a 36 os domínios de fadiga cognitiva 0 a 40 pontos, e o psicossocial de 0 a 8 pontos. Mais pontos significaram maior impacto da fadiga nas áreas física, cognitiva e psicossocial. Valores abaixo de 38 indicam ausência de fadiga (Anexo 4).

3.8. Protocolo da fotobiomodulação

Quanto aos protocolos da fotobiomodulação, os artigos de interesse foram identificados a partir da realização de uma pesquisa pelo título e resumo. Foram incluídos artigos que abordassem o tema da fotobiomodulação em modelos experimentais ou ensaios clínicos na EM ou em células do SNC. Os artigos que não foram pertinentes à pesquisa foram excluídos (Quadro 1). Em um segundo momento, os artigos selecionados foram analisados, após isso foi criado um protocolo inicial.

Quadro 1. Resumo dos parâmetros encontrados na literatura

Autores, ano	Potência (mW)	Tempo (seg)	Exposição radiante (J/cm²)	Energia Total (J)	Comprimento da onda (nm)	Tipo de estudo
Muili et al., 2013	2100	180	5	375	670	In vivo
Muili et al., 2012	2100	180	5	375	670	In vitro
Gonçalves et al., 2015	30	20	10	0,6 J	660	In vivo
Gonçalves et al., 2015	70 W	20	3		904	In vivo
Kubsik et al., 2016	50	30	-	3	650	Ensaio Clínico
Song et al., 2012	64.6	-	-	-	632.8	In vitro
Ailioaie et al., 2014	-	-	-	-	635,	Ensaio clínico,
Wong-Riley et al., 2005	-	70	4	-	830	In vitro
Wong-Riley et al., 2005	-	70	4	-	880	In vitro
Hashmi et al., 2011	50	40	-	-	810	In Vitro
Leden et al., 2013	50	-	-	10	808	In vitro

Para aplicação sublingual, foi colocado material plástico descartável cobrindo a caneta de aplicação. Foi solicitado ao paciente abertura da boca e levantamento da língua para posicionar a caneta do laser (figura 3).

A aplicação transcutânea na região da artéria radial o avaliador realizou palpação da artéria e em seguida realizou o posicionamento da caneta de aplicação (figura 4).

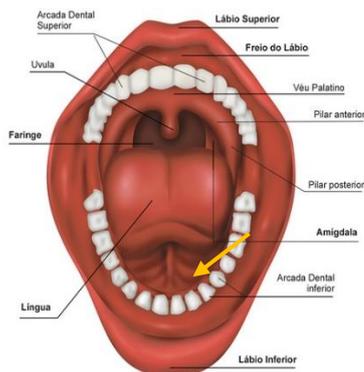


Figura 3. Local da aplicação fotobiomodulação sublingual.
Fonte: anatomiahumana.com



Figura. 4 Palpação da a. radial
Fonte: Arquivos pessoais

Para a irradiação os indivíduos foram posicionados de forma confortável em decúbito dorsal na maca ou em sedestação com apoio da cabeça ou membro superior posicionado na maca (figura 5). Em ambos os grupos de tratamento foi irradiado apenas 1 ponto, a ponta da caneta do laser foi recoberta com plástico filme transparente, sem apresentar nenhuma dobra a fim de evitar o espalhamento da luz e como consequência perda de energia.

Foi realizado, a aferição da potência do equipamento laser com dispositivo laser check da marca MMO, para ter certeza que não há perda de energia (figura 6). Cada ponto foi irradiado com laser therapy EC da marca DMC no comprimento de onda de 808 nm, 100 (mW) por 360 segundos (Tabela 2).



Figura 5. Posicionamento do paciente para irradiação na região sublingual e a. radial



Figura 6. Equipamento para aferir a potencia do laser de baixa intensidade

Tabela 2. Parâmetros da fotobiomodulação

Parâmetros	Sublingual	a. Radial
Comprimento de onda (nm)	808	808
Diâmetro (cm)	0,40	0,40
Área (cm ²)	0,13	0,13
Irradiança (W/cm ²)	0,80	0,80
Exposição radiante (J/cm ²)	287,00	287,00
tempo (s)	360	360
Energia (J)	36	36
tempo (s)	360	360
Número de pontos irradiados	1	1
Modo de operação	Contínuo	Contínuo
Número e a frequência das sessões de tratamento	24 sessões 2 vezes na semana	24 sessões 2 vezes na semana

3.9. Protocolo dos exercícios de fisioterapia

Os exercícios foram realizados 2 vezes por semana, após a fotobiomodulação. Foram realizados circuitos de exercícios com enfoque funcional, priorizando as terapias proprioceptivas e sensoriais. Foram realizados exercícios de equilíbrio estático e dinâmico, fortalecimentos dos membros inferiores e superiores.

3.10. Análise estatística

Os dados foram tabulados e tratados no software GraphPad PRISM versão 7.0. Os valores foram testados quanto a sua normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov, e foram expressos em média e desvio padrão pois assumem a curva de Gauss. Para comparação entre os grupos foi realizado ANOVA, o teste de contraste (Pós- HOC) utilizado foi o Tukey, para a comparação dependente foi realizado o teste t pareado, e na comparação de 2 grupos independentes foi realizado o teste t não pareado. Foi considerado um nível de significância de 0,5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1. Expressão proteica da IL-10

Os resultados mostram que expressão proteica da IL-10 no grupo controle de indivíduos saudáveis expressa menor quantidade da IL-10 (** $p < 0,001$) ANOVA em comparação com indivíduos que possuem diagnóstico de EM pré tratamento (figura 7).

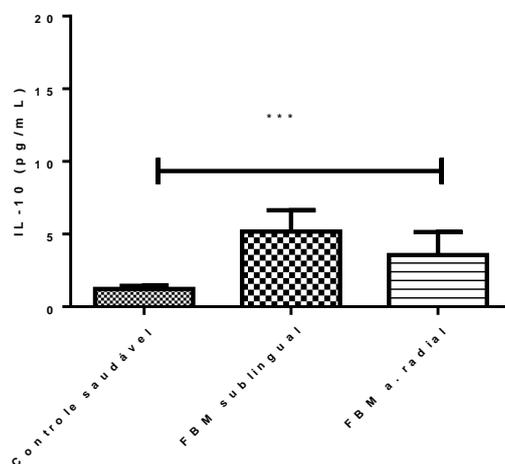


Figura 7. Comparação da expressão proteica da IL-10 pré tratamento com FBM.

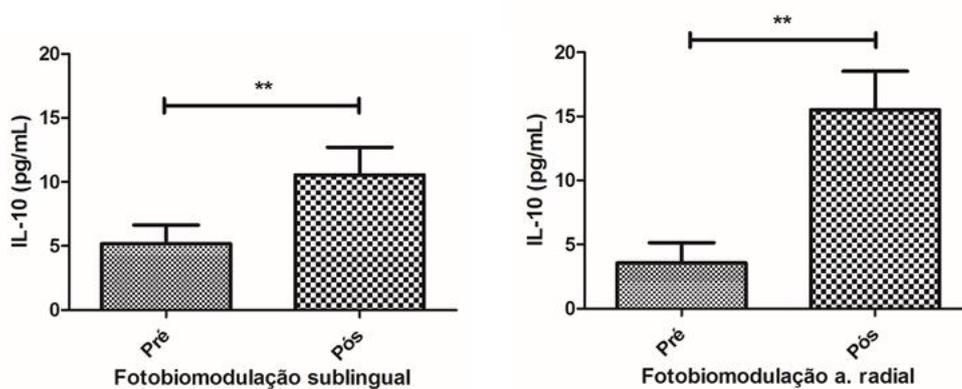


Figura 8. Comparação da expressão da IL-10 após o tratamento com FBM.

Após o tratamento com FBM a expressão da IL-10 aumentou (** $p < 0,01$) teste T pareado (figura 8). Comparando pós tratamento entre os grupos sublingual e a. radial não há diferença significantes ($p > 0,05$) teste T não pareado (figura 9).

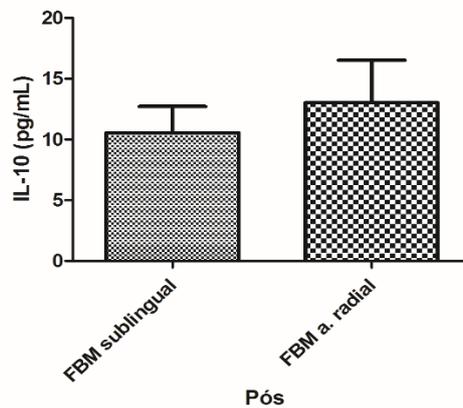


Figura 9. comparação entre grupos da expressão da IL-10 após o tratamento com FBM.

4.2. Expressão proteica da IL-6

A expressão proteica da IL-6 foi analisada através do ensaio ELISA, os resultados pré tratamento mostram que a expressão da IL-6 está aumentada em ambos os grupos, e não há diferença significantes quando comparados ($p > 0,05$) Teste T não pareado (figura 10). Após o tratamento com a fotobiomodulação os resultados mostram que não houve alteração nos níveis de IL-6 no tratamento sublingual ($p > 0,05$) e a. radial ($p > 0,05$) teste T pareado (figura 11).

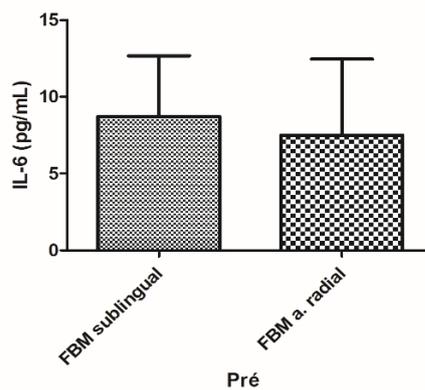


Figura 10. Comparação da expressão IL-6 pré tratamento com FBM entre os grupos.

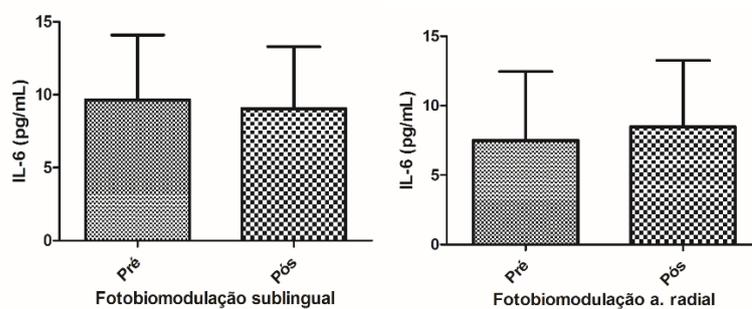


Figura 11. Comparação da expressão IL-6 entre grupos após tratamento com FBM.

4.3. Nitrito

A expressão de nitritos no grupo controle saudável possui os níveis de nitrito mais baixos em comparação aos grupos de indivíduos com EM (* $p < 0,05$) ANOVA (figura 12).

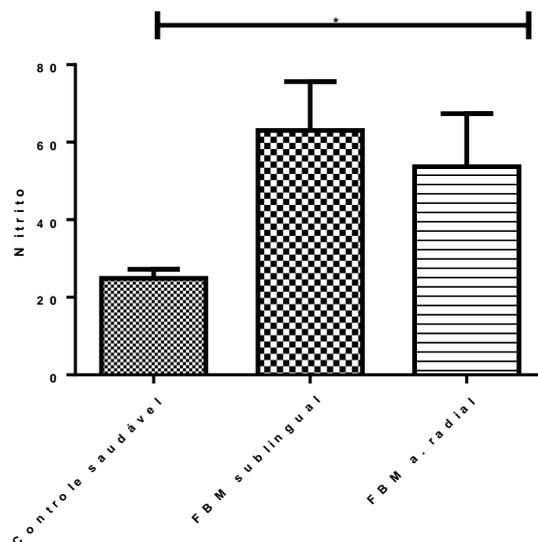


Figura 12. Comparação nos níveis de nitrito pré tratamento com FBM.

Após o tratamento com FBM sublingual houve redução nos níveis de nitrito após o tratamento (** $p < 0,01$) teste T pareado. Em contraste com o grupo fotobiomodulação a. radial percebemos discreta redução dos níveis de nitrito, porém sem significância ($p > 0,05$) teste T pareado (figura 13)

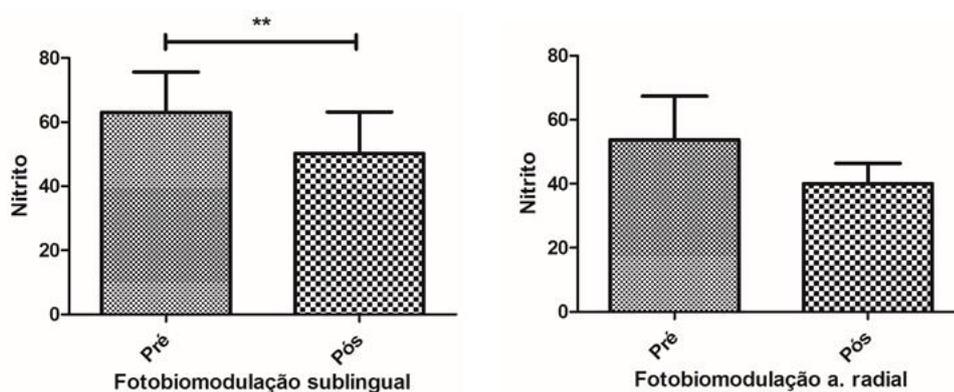


Figura 13. Comparação dos níveis de nitrito pós tratamento

4.4. Escala modificada do impacto da fadiga (EMIF)

Na análise do grupo FBM sublingual foi observada diminuição dos scores da MFIS após o tratamento sublingual (* $p < 0,05$) teste T pareado. No entanto na análise FBM a. radial foi observada uma discreta diminuição dos scores da EMIF, porém sem resultados estatisticamente significantes ($p > 0,05$) teste T pareado. (figura 14)

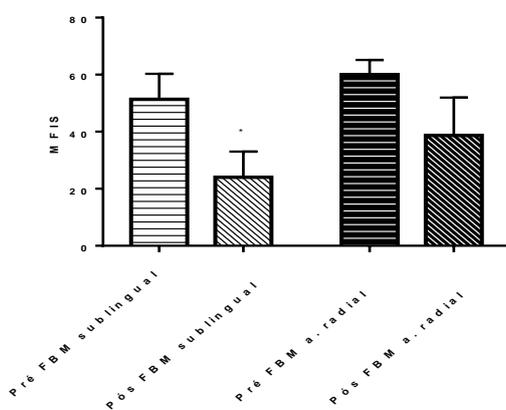


Figura 14. Comparação dos escores da EMIF após FBM.

5. Discussão

Foram investigados os efeitos da PBM baseados nos estudos realizados no modelo experimental de encefalomielite autoimune (EAE), pois este modelo mimetiza a EM e vem sendo estudado para descobrir avanços sobre a fisiopatologia e novas modalidades de tratamento³. Atualmente os indivíduos com EM são tratados por equipe multidisciplinar, que busca tratar o paciente de forma individual para melhorar qualidade e a participação do indivíduo em suas atividades diárias^{9,10}. As intervenções farmacológicas atuais têm como objetivo deixar a progressão da doença lenta, pois nem sempre é possível evitar a formação de focos inflamatórios além de seus efeitos colaterais e falhas terapêuticas. Sendo assim o tratamento para a EM depende de novas modalidades terapêuticas que possam prevenir principalmente a disfunção mitocondrial sendo essa uma tentativa de impedir a progressão da doença^{9,10}. O objetivo desta pesquisa foi avaliar uma nova abordagem para complementar o tratamento da esclerose múltipla e assim melhorar a inflamação estresse oxidativo.

A FBM pode ser um tratamento promissor nas doenças de SNC como a EM, e vem sendo estudada em células neurais e modelos experimentais, tais como a EAE. Os pesquisadores realizaram a irradiação de forma local, porém estes estudos mostram uma variedade de parâmetros dosimétricos que vai desde luz vermelha a IV, além disso não é bem definido a quantidade de dias do tratamento^{3,15,22,23,24,25}. Por outro lado, sabe-se que os efeitos da FBM são dependentes do comprimento de onda e energia que são entregues no tecido alvo, Lende et al. 2013³¹ mostraram que o comprimento de onda 808 nm com energia de 0,2 – 10 J/cm² é capaz de estimular as micróglia de forma positiva, portanto nesta pesquisa foi utilizado este comprimento de onda e energia de 9 J/cm², 2 vezes na semana em 24 sessões. Após estabelecer os parâmetros de acordo com os achados na literatura, foi elaborado um protocolo e publicado paper em revista internacional *Medicine* sob o título *Effect of photobiomodulation treatment in the sublingual, radial artery region, and along the spinal column in individuals with multiple sclerosis: Protocol for a randomized, controlled, double-blind, clinical trial* (Apêndice 1).

Os efeitos sistêmicos da FBM também foram avaliados, porém a literatura mostrou-se escassa sobre este assunto. A irradiação foi realizada em direção a circulação sanguínea, pois acordo com a literatura, a FBM pode produzir efeitos em outras regiões do corpo, além do local onde a irradiação foi realizada.

O trabalho de Samoilova et al. 2006, avaliou o efeito sistêmico da FBM em indivíduos saudáveis, e os resultados mostraram que a luz IV foi capaz de reduzir as citocinas pró-inflamatórias e modular expressão das citocinas anti-inflamatórias positivamente, pois o fato de as células no tecido produzirem substâncias que se espalham e circulam nos vasos sanguíneos e no sistema linfático é uma possível explicação, porém os efeitos sistêmicos ainda não foram bem estabelecidos. Corroborando com esses resultados, Huang et al. 2012 investigaram o efeito da irradiação intravascular na a. radial em indivíduos com lesão medular crônica, onde houve uma redução no estresse oxidativo e citocinas inflamatórias²⁸. Os dados desta pesquisa apoiam que a FBM possui efeito sistêmico, pois realizamos a irradiação transcutânea em direção a a. radial e na região sublingual, e nossos resultados mostram que houve uma modulação positiva principalmente nas citocinas anti-inflamatórias e estresse oxidativo.

O equilíbrio entre as citocinas pró- inflamatórias e anti-inflamatórias é importante no manejo da EM, neste cenário os tratamentos eficazes devem induzir uma mudança na resposta anti-inflamatória, como por exemplo estimular o aumento da IL-10³². Os resultados da presente pesquisa mostram que os níveis de IL-10 pré tratamento com FBM foram maiores no indivíduos com EMRR em comparação com controle saudável, esse resultado vai de encontro com os achados do estudo Kallaur et al. 2013³², que compararam o perfil das citocinas de indivíduos com EMRR e saudáveis e os níveis de IL-10 foram maiores nos pacientes com EMRR, isso porque os medicamentos também possuem ação de aumentar os níveis de IL-10. A FBM mostrou-se promissora em aumentar os níveis da IL-10 em modelos animais e células^{3,22,23,24}. Lenden et al. 2013. mostraram que após a irradiação na micróglia, com comprimentos de onda 808 nm os níveis de IL-10 foram expressos em altas concentrações sendo capaz de induzir o fenótipo da micróglia M2, ou seja, expressando os fatores anti-inflamatórios como reparo e remodelação tecidual, desempenhando papel significativo na resolução da inflamação³¹. Tais achados corroboram com o

presente estudo, pois após o tratamento com FBM sistêmica houve aumento significativo da expressão da IL-10 ($p < 0,01$) em ambos os grupos.

Em contraste a esse resultado, não foram encontradas diferenças significativas após o tratamento com FBM sistêmica na IL-6 ($p > 0,05$). Sabe-se que os indivíduos com EM possuem níveis da IL-6 elevados quando comparados com controles saudáveis, e possui uma tendência a aumentar com o tempo da doença, isso porque a IL-6 desempenha papel pró inflamatório³³.

As citocinas pró inflamatórias promovem a ativação da micróglia que libera ERN, causando estresse oxidativo e consequentemente disfunção mitocondrial, desempenhando um papel fundamental na progressão EM¹⁰. As mitocôndrias são importantes na produção da ATP em neurônios, porém o dano a mielina aumenta a necessidade de energia^{19,20}, causando impacto nos processos que exigem alta demanda de energia, como por exemplo, transmissão de impulsos e transporte axonal, além disso a insuficiência bioenergética tem impactos notáveis nas células precursoras de OL que não conseguem se proliferar e se diferenciar em células maduras resultando em um distúrbio de mielinização³⁴. Wong-Riley et al. 2005 Mostraram resultados positivos da FBM com relação a diminuição do estresse oxidativo nos neurônios após o tratamento com comprimento de onda IV, pois houve regulação positiva da CCO, levando ao aumento do metabolismo energético em neurônios funcionalmente inativados por toxinas, além de prevenir a morte neural. Esses resultados corroboram com os trabalhos de Muili et al. 2013, Lenden et al. 2013, Song et al. 2012, Gonçalves et al. 2016, Huang et al. 2012, Poyton et al. 2011, mostraram que houve redução dos níveis de nitritos após a FBM, além disso observaram que o tratamento ofereceu neuroproteção e melhora clínica no modelo experimental EAE. Após 24 sessões de tratamento com FBM sublingual foram observados a redução significativa ($p < 0,01$) dos níveis de nitritos, e apesar de não haver resultados significantes após o tratamento na a. radial, observa-se uma tendência na redução dos níveis de nitrito após o tratamento com FBM.

A fadiga pode afetar até 90% dos pacientes com EM, e é considerada um sintoma que envolve fatores, físicos, cognitivos, e psicossociais, sendo que a inflamação e estresse oxidativo podem estar relacionados com fadiga, porém a literatura se mostra escassa em ensaios clínicos que comprovem a ligação entre

a fadiga e inflamação¹. Até o momento as escalas de avaliação da fadiga são subjetivas, neste estudo os participantes foram avaliados através da EMIF, os resultados mostraram que houve redução significativa ($p < 0,05$) após o tratamento com fotobiomodulação sublingual, em contra partida os resultados após o tratamento com FBM em direção a a. radial não foram significantes ($p > 0,05$), porém é possível observar uma tendência a reduzir a fadiga.

O tamanho e a homogeneidade da amostra podem ser uma ressalva a essas afirmativas.

6. Considerações Finais

Conclui-se que a FBM sistêmica pode ser um tratamento complementar e não farmacológico, uma vez que mostrou-se capaz de modular de forma positiva na resposta anti-inflamatória. O tratamento com FBM em direção a a. radial não mostrou resultados significantes com relação a diminuir os níveis de nitritos e a fadiga, porém conseguiu modular de forma positiva a expressão da IL-10. Já o tratamento com FBM sublingual mostrou-se eficaz em reduzir os níveis de nitrito e aumentar a expressão da IL-10 além de melhorar a fadiga.

7. Referências

1. Chalah MA, Ayache SS. Is there a link between inflammation and fatigue in multiple sclerosis? *J Inflamm Res.* 2018 Jun;11:253–64.
2. Rostami A, Ciric B. Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. *J Neurol Sci.* 2013 Oct 15;333(1-2):76-87
3. Gonçalves ED, et al. Low-level laser therapy ameliorates disease progression in a mouse model of multiple sclerosis. *Autoimmunity.* 2016 Dec 49:2:132-42
4. Deckx N, et al. 12 Weeks of Combined Endurance and Resistance Training Reduces Innate Markers of Inflammation in a Randomized Controlled Clinical Trial in Patients with Multiple Sclerosis. *Mediadores Inflamm.* 2016; 2016: 6789276.
5. Garg N, Smith T W. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain Behav.* 2015 Sep;5(9):e00362
6. Ransohoff R M, Hafler D A , Lucchinetti C F. Multiple sclerosis-a quiet revolution. *Nat Rev Neurol.* 2015 Mar;11(3):134-42.
7. Healy BC, Buckle GJ, Ali EN, et al. Characterizing Clinical and MRI Dissociation in Patients with Multiple Sclerosis. *J Neuroimaging.* 2017 Sep;27(5):481-485
8. Gelfand J M. Multiple sclerosis: diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. *Handb Clin Neurol.* 2014;122:269-90
9. Kubsik A, Klimkiewicz R, Janczewska K, Klimkiewicz P, Jankowska U, Woldańska-Okońska M. Application of laser radiation and magnetostimulation in therapy of patients with multiple sclerosis. *NeuroRehabilitation.* 2016 183–190
10. Kozin M S, Kulakova O G. Favorova O. Involvement of Mitochondria in Neurodegeneration in Multiple Sclerosis. *Biochemistry (Mosc);* 2018 Jul 83(7): 813-830

11. Chitnis T. The role of CD4 T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol.* 2007;79:43-72
12. Ghasemi M1, Fatemi A. Pathologic role of glial nitric oxide in adult and pediatric neuroinflammatory diseases. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014 Sep 45:168-82
13. Tsai S, Santamaria P. MHC Class II Polymorphisms, Autoreactive T-Cells, and Autoimmunity. *Front Immunol.* 2013 Oct 10;4:321
14. Pilli D, Zou A, Tea F, et al. Expanding Role of T Cells in Human Autoimmune Diseases of the Central Nervous System. *Front Immunol.* 2017 Jun 7;8:652.
15. Song S, Zhou F, Chen W R. Low-level laser therapy regulates microglial function through Src-mediated signaling pathways: implications for neurodegenerative diseases. *J Neuroinflammation.* 2012; 9: 219.
16. Paloczi J, Varga ZV, Hasko G, et al. Neuroprotection in oxidative stress-related neurodegenerative diseases:role of endocannabinoid system modulation. *Antioxid Redox Signal.* 2018 Jul 1;29(1):75-108
17. Tang X, Lan M, Zhang M, Yao Z. Effect of nitric oxide to axonal degeneration in multiple sclerosis via downregulating monocarboxylate transporter 1 in oligodendrocytes. *Nitric Oxide.* 2017 Jul 1;67:75-80
18. Ibragic S, Sofic E, Suljic E, Avdagic N, Bajraktarevic A, Tahirovic I. Serum nitric oxide concentrations in patients with multiple sclerosis and patients with epilepsy. *J Neural Transm (Vienna).* 2012 Jan;119(1):7-11
19. Fernández JC, Morales A, Marí M, Garcia R C, Colell U. Oxidative stress and altered mitochondrial function in neurodegenerative diseases: lessons from mouse models. *Neurol Disord Drug Targets.* 2010 Aug 9(4):439-54.
20. Hashmi J T, et al. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. 2010 Dec 2 :S292-305.
21. Hamblin M R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys.* 2017;4(3):337-361

22. Poyton R O, Ball K A. Therapeutic Photobiomodulation: Nitric Oxide and a Novel Function of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase. *Send to Discov Med*. 2011 Feb;11(57):154-9
23. Wong-Riley M T, et al. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem*. 2005 Feb 11;280(6):4761-71.
24. Muili K A, Gopalakrishnan S, Meyer S L, Eells J T, Lyons J A. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice by photobiomodulation induced by 670 nm light. *PLoS One*. 2012;7(1):e30655
25. Muili K A, Gopalakrishnan S, Eells J T, Lyons J A. Photobiomodulation induced by 670 nm light ameliorates MOG35-55 induced EAE in female C57BL/6 mice: a role for remediation of nitrosative stress. *PLoS One*. 2013 Jun 28;8(6):e67358.
26. Silva DFT, Gomes MT, Campos GRS. Fundamentos da fotobiomodulação. In: Fernandes KPS, Ferrari RAM, França CM. São Paulo. Uninove. 2017 Pg. 52 – 66.
27. Zhevago N A, Samoilova K A. Pro- and anti-inflammatory cytokine content in human peripheral blood after its transcutaneous (in vivo) and direct (in vitro) irradiation with polychromatic visible and infrared light. *Photomed Laser Surg*. 2006 Apr;24(2):129-39.
28. Huang S F, Tsai Y A, Wu S B, Wei Y H, Tsai P Y, Chuang T Y. Effects of intravascular laser irradiation of blood in mitochondria dysfunction and oxidative stress in adults with chronic spinal cord injury. *Send to Photomed Laser Surg*. 2012 Oct;30(10):579-86
29. Kazemi Khoo N, Iravani U , Arjmand H , Vahabi F , Lajevardi H , Akrami S M, Zamani Z . A metabolomic study on the effect of intravascular laser blood irradiation on type 2 diabetic patients. *Lasers Med Sci*. 2013 Nov;28(6):1527-32
30. Ailioaie L M, et al. Innovations and Challenges by Applying Sublingual Laser Blood Irradiation in Juvenile Idiopathic Arthritis. *J of Photoenergy*, 2014

31. Leden RE, Cooney SJ, Ferrara TM, et al. 808 nm wavelength light induces a dose-dependent alteration in microglial polarization and resultant microglial induced neurite growth. *Lasers Surg Med.* 2013 Apr;45(4):253-63

32. Kallaur AP, Oliveira SR, Simão NA, et al. Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients and the association between progression and activity of the disease. *Mol Med Rep.* 2013 Mar; 7 (3): 1010-20..

33. Heesen C , Schulz H, Schmidt M, et al. Endocrine and Cytokine Responses to Acute Psychological Stress in Multiple Sclerosis. *Brain Behav Immun.* Jun de 2002; 16 (3): 282-7.

34. Adiele RC, Adiele CA. Metabolic defects in multiple sclerosis. *Mitocôndria* 2017 13 de dez. 1567-7249 (17) 30057-0

8. Apêndice

8.1. Artigo publicado na forma de Protocolo na revista Medicine

Fator de impacto 2.02

Study Protocol Clinical Trial



OPEN

Effect of photobiomodulation treatment in the sublingual, radial artery region, and along the spinal column in individuals with multiple sclerosis

Protocol for a randomized, controlled, double-blind, clinical trial

Tamiris da Silva, PgDip^a, Fernanda Cordeiro da Silva, PhD^a, Andréa Oliver Gomes, MSc^a, Ariane Oliveira Viana, MSc^a, Marcela Letícia Leal Gonçalves, MSc^a, Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues, PhD^a, Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana, PhD^a, Daniela de Fátima Teixeira da Silva, PhD^a, Maria Cristina Chavantes, PhD^a, Yara Dadalti Fragoso, PhD^b, Luciana Prats Branco, MDP^b, Lara Jansiski Motta, PhD^a, Kristianne Porta Santos Fernandes, PhD^a, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari, PhD^a, Sandra Kalil Bussadori, PhD^{a,*}

Abstract
Background: Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease, for which the forms of treatment are medication and rehabilitation. However, in vitro and in vivo studies have demonstrated that photobiomodulation can be an effective treatment modality for inflammatory diseases, including MS. Photobiomodulation has a broad range of benefits, such as the avoidance of cell and tissue death, the stimulation of healing and injury repair, reductions in pain, edema and inflammation, cell proliferation, and even apoptosis. The outcomes of photobiomodulation include the regeneration of cells, the stimulation of the growth of Schwann cells, a reduction in spasticity, functional improvements, a reduction in nitric oxide levels, and the upregulation of the cytokine IL-10, demonstrating that this therapeutic modality can offer neuroprotection.

Methods: A randomized, controlled, double-blind, clinical trial is proposed. The patients will be divided into 6 groups. Groups 1 and 2 will receive sham and active photobiomodulation in the sublingual region, respectively. Groups 3 and 4 will receive sham and active photobiomodulation along the spinal cord, respectively. Group 5 will receive placebo treatment with photobiomodulation on the skin in the region of the radial artery with a specific bracelet. Group 6 will be treated with photobiomodulation on the skin in the region of the radial artery.

Discussion: Treatment for MS is directed at the immune response and slowing the progression of the disease. This is one of the first clinical trials involving photobiomodulation in the sublingual region and along the spinal cord, which could help establish a promising new form of nonpharmacological treatment for autoimmune diseases. This is one of the first clinical trials with sublingual photobiomodulation and along the spinal cord that could help establish a new form of promising treatment of the disease associated with pharmacological treatment.

Abbreviations: CNS = central nervous system, CONEP = National Research Ethics Committee, EDSS = Expanded Disability Status Scale, ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, MS = multiple sclerosis.

Keywords: low-level laser therapy, multiple sclerosis, oxidative stress, photobiomodulation, physical therapy

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating, neurodegenerative, inflammatory disorder of the central nervous system (CNS) characterized by the selective destruction of the myelin

sheath.^[1,2] MS has a complex, multifactor etiology that is not fully understood, but it is believed that the formation of demyelinating lesions may be due to autoimmune processes as well as environmental and genetic factors.^[3,4]

Inflammation of the CNS is an important mechanism that contributes to demyelination and neurodegeneration. Th1, Th17, and B cells are activated in peripheral regions, pass through the blood-brain barrier, and interact with antigen-presenting cells (astrocytes, microglia, macrophages, and dendritic cells), inducing the production of proinflammatory cytokines and oxidative stress.^[5,6] B lymphocytes serve as specific antigen-presenting cells for T cells and produce specific antibodies for myelin antigens, making myelin the target of immune cells that mistake it for a foreign antigen.^[6,7]

Oxidative stress occurs due to the accumulation of free radicals (reactive oxygen and nitrogen species),^[8] which leads to inflammation, oligodendrocyte damage, abnormalities in

The authors have no funding and conflicts of interest to disclose.

^aNovo de Juho University (UNINOVE), ^bUniversity Metropolitana de Santos (UNIMES) University, Santos, Brazil.

**Correspondence: Sandra Kalil Bussadori, Department of Biophotonics, Novo de Juho University (UNINOVE), São Paulo-SP, Brazil (e-mail: sandrikal@un9.pro.br)*

Copyright © 2018 the Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc.

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License 4.0 (CCBY) which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Medicine (2018) 97:19(e0627)

Received: 9 April 2018 / Accepted: 11 April 2018

<http://dx.doi.org/10.1097/MD.0000000000001062>

synaptic transmissions, axonal degeneration, and neuronal death, suggesting that oxidative stress is an important factor in neurodegeneration.^[9,10] Myelin and oligodendrocyte damage caused by inflammation gives rise to a multitude of symptoms, such as sensory alterations, fatigue, physical and/or mental disability, balance disorders, spasticity, muscle weakness, urinary incontinence, cognitive impairment, neuropathic pain, and visual deficiency.^[11,3]

This disease occurs in different forms, such as relapsing-remitting MS, which is characterized by sudden-onset short-term or long-term relapses, secondary progressive MS, which has a progressive course that results in severe, irreversible disability, and primary progressive MS, which is a progressive type with no relapses or periods of remission.^[11,12]

Prognosis is unpredictable with regard to the disability that occurs due to the manifestations of the disease, which are normally associated with progressive locomotion impairment.^[12] Treatment is directed at the immune response and slowing the progression of the disease, which can be achieved with the use of drugs.^[12,13] Moreover, rehabilitation can lead to improvements in walking capacity, cognition, fatigue, depression, quality of life, participation in activities, muscle strength, cardiovascular performance, and balance.^[13,14]

In vitro and in vivo studies have demonstrated that photobiomodulation is effective for inflammatory diseases, including MS.^[15] This therapeutic modality has a broad range of benefits, such as the avoidance of cell and tissue death, the stimulation of healing and injury repair, reductions in pain, edema and inflammation, cell proliferation, and even apoptosis.^[15,16] The outcomes of photobiomodulation include the regeneration of cells, the stimulation of the growth of Schwann cells, a reduction in spasticity, functional improvements, a reduction in nitric oxide levels, and the upregulation of the cytokine IL10, demonstrating that this therapeutic modality can offer neuroprotection.^[15,17]

The aim of the proposed study is to evaluate whether photobiomodulation in the sublingual region and along the spinal cord modulates the expression of IL-10, TNF- α , and nitric oxide in individuals with MS. The main objective of this study is to evaluate if the photobiomodulation along the spinal cord in the sublingual region and irradiation in the radial artery can modulate the expression of IL-10, TNF- α , and nitric oxide.

2. Methods/Design

2.1. Type of study

A controlled, clinical trial is proposed, which will follow the guidelines for research involving human subjects stipulated in Resolution 466/2012 of the Brazilian National Board of Health and will be submitted for approval from the Human Research Ethics Committee of University Nove de Julho. The participants or their legal guardians will sign statements of informed consent authorizing participation in the study.

2.2. Trial registration

Clinical.trials.gov as NCT03360487, first received in 4 December 2017, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03360487>.

2.3. Sample calculation

The sample size was calculated to ensure a 95% test power. It was determined that with 32 individuals and an effect size of 0.8, the test power would be 0.9566, thereby maintaining the significance level at $\alpha = 0.05$ (Fig. 1).

Inclusion criteria: diagnosis of MS, age between 18 and 60 years, currently undergoing pharmacological treatment, capable of understanding and following verbal instructions and score of <6 on the Expanded Disability Status Scale. No restriction will be imposed regarding gender.

Exclusion criteria: other autoimmune disease and/or tumor, relapse of disease activity during treatment, and not undergoing pharmacological treatment. Other autoimmune diseases; neoplasias, heart failure, respiratory failure, renal insufficiency, hepatic insufficiency, acquired immunodeficiency syndrome, and patients with relapses of the disease.

2.4. Recruitment and randomization

Patients will be recruited from the Integrated Health Clinic of University. Patients with a diagnosis of MS will be screened for the eligibility criteria through telephone interviews. Selected individuals with a signed statement of informed consent will be randomized. Randomization will be performed in blocks. Groups 1 and 2 will receive sham and active photobiomodulation in the sublingual region, respectively. Groups 3 and 4 will receive sham

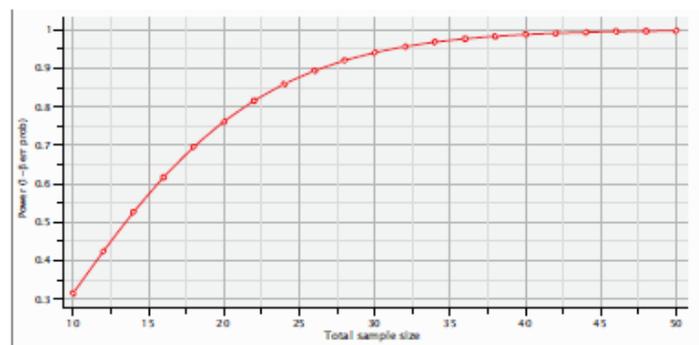


Figure 1. Sample calculation.

and active photobiomodulation along the spinal cord, respectively. Group 5 will receive placebo treatment with photobiomodulation on the skin in the region of the radial artery with a specific bracelet. Group 6 will be treated with photobiomodulation on the skin in the region of the radial artery. The participants will not be deprived of any medication for the treatment of the base condition. Randomization will be stratified by clinic using block allocation tables to ensure equal proportions in the distribution of treatments. The participants and evaluator will be blinded to the allocation.

3. Evaluations

3.1. EDSS

The participants will be evaluated before and after treatment using the Expanded Disability Status Scale administered by a physiotherapist (approximate application time: 15 minutes).

Blood collection for analyzes of inflammation, oxidative stress. All participants will go through a medical consultation at the UNINOVE clinic, to confirm the diagnosis of MS, and after which it will be collected by a nurse blood samples (10mL) will also be taken for the determination of IL-10 (anti-inflammatory), TNF- α , and nitric oxide (proinflammatory). The evaluation of these cytokines will be through ELISA and Griess reaction.

3.2. Treatment

The participant will be placed on an examining table in a comfortable position. Both the operator and participant will use eye protection.

Transcutaneous irradiation of the spinal cord will be performed on segments corresponding to the nerve roots of the lumbosacral plexus (T12-S5) and cervicothoracic plexus (C5-T1-2). Twenty points will be irradiated for 90 seconds (total treatment time: 1800seconds). In the group submitted to sublingual irradiation, disposable plastic wrap will cover the application pen for the purposes of hygiene, (total treatment time: 360 seconds). In the group submitted photobiomodulation on the skin in the region of the radial (total treatment time: 360 seconds).

The treatment will be performed twice a week totaling 24 consecutive weeks and after 3 months of treatment the patients will be submitted to reassessment of all complementary tests that have been requested, cytokines, nitric oxide, and EDSS.

3.3. Photobiomodulation protocol

With regard to the photobiomodulation protocols, the articles of interest were identified through a bibliographic survey of titles and abstracts. The selected articles were analyzed and used for the establishment of the treatment protocol (Table 1).

3.4. Statistical analysis

The data will be tabulated and treated using the SPSS 20.0 for Windows. Descriptive statistics will be performed. The chi-square test and Fisher exact test will be used to test associations with the categorical variables. The Student *t* test will be used and Pearson's correlation coefficients will be calculated for the analysis of correlations among the continuous variables. The level of significance will be set at 95% ($P < .05$).

4. Discussion

Treatment for MS is directed at the immune response and slowing the progression of the disease. This is one of the first clinical trials

Table 1

Laser parameters.

Parameter	Unidade	Spinal cord	Sublingual	Artéria radial
Center wavelength	nm	808	808	808
Diameter	cm	0.4	0.4	0.4
Area	Cm ²	0.1256	0.1256	0.1256
Irradiance	(W/cm ²)	1433	287	287
Time	s	1800	360	360
Energy	J	1,799,848	360,472	360,472

involving photobiomodulation in the sublingual region and along the spinal cord, which could help establish a promising new form of nonpharmacological treatment for autoimmune diseases.

5. Declarations

5.1. Ethics committee

The Ethics Committee of the University of Nove de Julho (UNINOVE) approved this project with number 2.423.755, in accordance with the guidelines of the National Ethics Committee (CONEP). Any modifications to the protocol that may have an impact on the conduct of the study will be reported to the UNINOVE Ethics Committee.

Informed consent/consent (which was approved by the UNINOVE Ethics Committee) will be signed by the volunteers on the day of the interview.

The biological material (blood) will be discarded after the study.

5.2. Data collection methods

The authors were previously trained to collect data and a trained professional for blood collection. All authors are qualified in laser therapy.

All data will be entered electronically. The participants' files will be stored in numerical order in a safe place and accessible only to the authors of this study.

5.3. Discontinuing intervention

If volunteers become ill or do not adapt to therapy, it will not be possible to continue laser therapy.

5.4. Availability of data and materials

The datasets generated and analyzed during the present study are available from the corresponding author at reasonable request. After the analysis of the data, volunteers will be invited to a meeting and the results will be shared and they will become public.

Acknowledgments

To the University Nove de Julho (UNINOVE) for the availability of laboratories and volunteers.

Author contributions

Conceive and design the study: TS, SKB, RAMF, MFSDR; will perform the experiment: TS, FCS, YDF, MLLG, MFSDR, SKB; will analyze the data: TS, ACRTH, DFTS, MCX, AOG; will

perform the statistical analysis: TS, ACRTH, DFTS, AOV, LPB, SKB; write the paper: TS, AOG, FCS, RAMF, MLLG, SKB.

Conceptualization: Tamiris da Silva, Ariane Oliveira Viana, Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues, Maria Cristina Chavantes, Sandra Kalil Bussadori.

Data curation: Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana.

Formal analysis: Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues, Luciana Prats Branco.

Investigation: Tamiris da Silva, Ariane Oliveira Viana.

Methodology: Tamiris da Silva, Andréa Oliver Gomes, Ariane Oliveira Viana, Maria Cristina Chavantes.

Project administration: Tamiris da Silva, Maria Cristina Chavantes, Sandra Kalil Bussadori.

Resources: Kritianne Porta Santos Fernandes.

Software: Marcela Leticia Leal Gonçalves, Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana.

Supervision: Tamiris da Silva, Fernanda Cordeiro da Silva, Sandra Kalil Bussadori.

Validation: Tamiris da Silva, Daniela de Fátima Teixeira da Silva, Yara Dadalti Fragoso, Lara Jansiski Motta.

Visualization: Fernanda Cordeiro da Silva, Andréa Oliver Gomes, Ariane Oliveira Viana, Marcela Leticia Leal Gonçalves, Daniela de Fátima Teixeira da Silva, Lara Jansiski Motta, Kritianne Porta Santos Fernandes.

Writing – original draft: Tamiris da Silva, Fernanda Cordeiro da Silva, Andréa Oliver Gomes, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari, Sandra Kalil Bussadori.

Writing – review and editing: Andréa Oliver Gomes, Yara Dadalti Fragoso, Kritianne Porta Santos Fernandes, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari, Sandra Kalil Bussadori.

References

- Ransohoff RM, et al. Multiple sclerosis—a quiet revolution. *Rev Neurol* 2015;11:134–42.
- Albarracín JDF, Segura OME. Esclerosis múltiple en pacientes pediátricos: fisiopatología, diagnóstico y manejo. *Rev Med UNABI Vol 1* 2012;14:167–79.
- Kubisk A, et al. Application of laser radiation and magnetostimulation in therapy of patients with multiple sclerosis. *NeuroRehabilitation* 2016; 183–90.
- Deckx N, et al. 2 Weeks of Combined Endurance and Resistance Training Reduces Innate Markers of Inflammation in a Randomized Controlled Clinical Trial in Patients with Multiple Sclerosis. *Mediators of Inflammation* Volume 2016, Article ID 6789276, 13 pages. <https://doi.org/10.1155/2016/6789276>.
- Murphy AC, Lalor SJ, Lynch, et al. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun* 2010;24:641–51.
- Pilli D, Zou A, Teo F, et al. Expanding role of T cells in human autoimmune diseases of the central nervous system. *Front Immunol* 2017;8:1–6.
- Lisak RP, Nedelkoska L, Benjamin JA, et al. B cells from patients with multiple sclerosis induce cell death via apoptosis in neurons in vitro. *J Neuroimmunol* 2017;309:88–99.
- Voigt D, Scheidt U, Derfuss T, et al. Expression of the antioxidative enzyme peroxiredoxin 2 in multiple sclerosis lesions in relation to inflammation. *Int J Mol Sci* 2017;18:760.
- Ghasemi M, Fatemi A. Pathologic role of glial nitric oxide in adult and pediatric neuroinflammatory diseases. *Neurosci Biobehav Rev* 2014;5: 168–82.
- Calabrese V, Calabrese C, Rizzarelli E, et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:766–75.
- Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, et al. Multiple sclerosis. Published online March 22, 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30481-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30481-1).
- Hempel S, et al. A systematic review of modifiable risk factors in the progression of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2017;23:525–33.
- Alvarenga PH, Sacramento PM, Ferreira TR, et al. Combined exercise training reduces fatigue and modulates the cytokine profile of T cells from multiple sclerosis patients in response to neuromediators. *J Neuroimmunol* 2016;293:91–9.
- Learmonth YC, Adamson BC, Balto JM, et al. Investigating the needs and wants of healthcare providers for promoting exercise in persons with multiple sclerosis: a qualitative study. *Disabil Rehabil* 2017;19:1–9.
- Gonçalves DG, et al. Low-level laser therapy ameliorates disease progression in a mouse model of multiple sclerosis. *Autoimmunity* 2016;49:132–42.
- Muili KA, Gopalakrishnan S, Meyer SL, et al. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice by photobiomodulation induced by 670 nm light. *PLoS One* 2012; 7:1–9.
- Muili KA, Gopalakrishnan S, Meyer SL, et al. Photobiomodulation induced by 670 nm light ameliorates MOG35 induce EAE in female C57BL/6 mice: a role for remediation of nitrosative stress. *PLoS One* 2013;8:e67358.

8.2. Artigo que será submetido no Multiple Sclerosis Journal

Fator de impacto: 5.280

Effect of photobiomodulation on nitrosative stress in individuals with relapsing-recurring multiple sclerosis: Pilot study

Multiple sclerosis (MS) is characterized by the formation of localized inflammation that causes demyelination and the death of oligodendrocytes.^{1,2} Although the exact cause remains unknown, MS is considered to be a disease with a multifactor etiology involving genetic and environmental factors and the main pathogenic role is attributed to the immune system.⁴

Initially, T cells are activated in the peripheral compartment by antigen-presenting cells, which have specific antigens of myelin proteins, such as basic myelin protein, myelin-associated glycoprotein and myelin oligodendrocyte glycoprotein.^{13,14} The migration of T cells to the central nervous system then occurs through the layer of the endothelial cells of the blood-brain barrier. These cells then release a set of proinflammatory cytokines, such as interleukin 6, interferon and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), which lead to the activation of microglia.¹¹

Microglia have capacities similar to those of macrophages, including phagocytosis and the production of inflammatory cytokines, such as TNF- α ,¹² which, in turn, destroys the myelin and axons, resulting in demyelination and the reduction in or interruption of synapses. When demyelinating plaques are formed, the microglia release proinflammatory molecules, such as nitric oxide (NO), causing secondary damage to the neurons and surrounding cellular environment as well as causing mitochondrial dysfunction and the consequent death of

oligodendrocytes.^{5,15} Demyelination leads to the blocking of synapses, triggering multiple symptoms, such as visual impairment, spasticity, muscle weakness, fatigue, compromised gait, coordination difficulties, tremors/ataxia, neuropathic pain, cognitive deficit, sensory deficit, compromised bladder control, emotional problems, etc.³

Drug treatment is capable of promoting a balance in proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, but has a number of undesirable side effects. Therefore, successful treatment has not yet been achieved. Rehabilitation with a multidisciplinary team can lead to improvements in gait, muscle strength, cognition, fatigue, depression, quality of life and participation in tasks.^{9,10}

Photobiomodulation (PBM) therapy is the use of any low-intensity light source capable of biostimulating or bioinhibiting cellular processes. PBM has been used for different treatments, as it can deeply penetrate tissues and offers a variety of therapeutic effects.²² Therefore, PBM therapy could play an important role in the treatment of MS.

Methods

The present randomized, controlled, clinical trial was developed at the Integrated Health Clinic of University Nove de Julho in compliance with norms governing research involving human subjects (Resolution 466/2012) and received approval from the ethics committee of the university (certificate number: 2.423.755). The volunteers agreed to participate in the study by signing a statement of informed consent (Appendix 1). The protocol for this study was registered with Clinical Trials (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03360487).

Recruitment and eligibility criteria

Fourteen men and women were recruited from the Integrated Health Clinic of the university (Table 1) based on the following inclusion criteria: diagnosis of relapsing-remitting multiple sclerosis, age 18 to 60 years, undergoing drug therapy, capable of understanding and responding to verbal stimuli and score of < 6 on the Expanded Disability Status Scale (EDSS). The exclusion criteria were associated autoimmune disease, neoplasm, heart, respiratory, kidney or liver failure, acquired immunodeficiency syndrome and currently pregnant.

All patients were submitted to a medical evaluation to exclude differential diagnoses and for the administration of the EDSS. A physiotherapeutic evaluation was also performed to determine the physiotherapeutic objectives.

Table 1. Characterization of sample

	<i>Sublingual</i>	<i>Radial</i>
Nº Participants	4	3
Age	40.0 ± 2,0	35.0± 3,0
EDSS score	3.0 ± 2,0	3.0 ± 2.0
Sex (F/M)	F	F
Nº of sessions	12	12

The individuals who met the eligibility criteria were randomized using a simple lottery system with sealed envelopes. The following groups were formed: Group 1 – PBM in the sublingual region; Group 2 – PBM in the region of the radial artery; Ten 10 mL of blood were collected from the participants before and after treatment. After centrifugation for 10 minutes at 2800 rpm, the serum layers were

collected in aliquots of 100 microliters (μL) in Eppendorf tubes for each patient and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

Evaluation of nitrite

Nitrite was quantified in the serum samples using the Griess assay. The samples were incubated with the Griess reagent at room temperature for 10 minutes and optical density was read in a spectrophotometer at 450 nm.

Photobiomodulation protocol

The individuals were positioned comfortably in the supine position on a cot with the head supported. For sublingual irradiation, a disposable plastic wrap was used to cover the application pen and the patient was instructed to open the mouth and raise the tongue for the proper positioning of the laser pen. For transcutaneous irradiation in the region of the radial artery, the operator palpated the artery to determine the proper positioning of the laser pen.

Results

The results showed a tendency toward a reduction in nitrite levels after 12 sessions of PBM, but the reduction was non-significant ($p>0,05$). Moreover, no significant difference ($p>0,05$) was found in the intra-group comparison of the group submitted PBM over the radial artery

The patients in both irradiated groups reported improvements in physical and mental fatigue, muscle pain and headache.

Discussion

In this study, we investigated the effects of PBM based on studies conducted with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), which is a model that mimics multiple sclerosis. Oxidative and nitrosative stress have been implicated in the both the onset and progression of EAE. Qi et al. demonstrated that mitochondrial defects are caused by an increase in NO resulting from inflammation in the central nervous system.²² Moreover, markers of oxidative stress are related to the early stages of the disease and may explain the irreversible damage associated with the chronic phase. Gonsalves et al. demonstrated that, based on clinical signs, the concentration of NO in the spinal cord of mice with EAE was significantly in comparison to control animals.

The aim of current treatments for MS is to slow the progression of the disease, as such treatments are not able to prevent future harm. Considering this limitation and the side effects of the drugs employed, the treatment of MS depends on novel therapeutic modalities that can prevent mitochondrial dysfunction. Therefore, our aim was to evaluate a novel approach based on PBM as a complement to treatment for MS.

The few studies that have addressed effective parameters for modulating nitrite levels in the EAE model offer varying results. Gonçalves et al. conducted an experiment with two groups irradiated with different wavelengths (one with 660 nm/3 J cm² and another with 904 nm/3 J cm²). Both groups were irradiated in

the region of the spinal cord for 30 days and the results demonstrated that both wavelengths were effective at reducing oxidative stress. Muili et al. (2013) administered a wavelength of 660 nm in the region of the spinal cord of animals once a day for seven consecutive days and also found a reduction in nitrite levels compared to the control group. Studies involving the EAE model report that different wavelengths of infrared light have different effects on the expression of nitrite, as PBM increases concentrations of oxygen in the cell, stimulating cytochrome c oxidase, which consequently inhibits the expression of markers of oxidative stress²². The present results show that 12 sessions of PBM therapy led to a tendency toward reducing nitrite levels, although the difference was non-significant.

A further aim of the present study was to evaluate the possible systemic effect of PBM by directing the irradiation to the blood circulation. However, the studies we used as reference directed irradiation to the spinal cord. According to the literature, PBM can produce effects in other regions of the body beyond the administration site. The fact that tissue cells produce substances that spread and circulate in both blood vessels and the lymphatic system is a possible explanation for this phenomenon, but the systemic effects have not yet been well established.²⁶ The present study shows that PBM may have effects. Besides the tendency toward diminishing nitrite levels, both groups of patients submitted to PBM reported improvements in fatigue, muscle pain and headache.

We conclude that systemic PBM seems to exert an influence on some symptoms of MS and has a tendency toward lowering nitrite level. Therefore, further studies should be conducted with a larger sample and greater number of sessions of photobiomodulation therapy.

9. Anexos

Anexo 1

TCLE - Termo de Consentimento para Participação em Pesquisa Clínica:

Nome do Voluntário: _____
Endereço: _____
Cidade: _____ CEP: _____
Telefone para contato: _____
E-mail: _____

1. Título do Trabalho Experimental: A efetividade da fotobiomodulação em indivíduos com Esclerose Múltipla – Ensaio clínico, controlado, randomizado e cego

2. Objetivo: Avaliar a eficácia da aplicação do laser em baixa intensidade em baixo da língua, na região da artéria radial (pulso) em indivíduos com Esclerose Múltipla. Avaliar se a aplicação do laser poderá alterar os níveis óxido nítrico, TNF alfa, IL-6 (substâncias inflamatórias) IL-10 (Substância anti-inflamatória).

3. Justificativa: Este estudo justifica-se uma vez que se verifica poucos estudos referente ao tratamento com o laser em baixa intensidade em indivíduos com esclerose múltipla.

4. Procedimentos da Fase Experimental: Você vai realizar uma avaliação através da Escala de Status de Expansão Expandida (EDSS) que será aplicada em 15 minutos, também vamos avaliar o seu equilíbrio, marcha, fadiga, e a sua qualidade de vida, essas avaliações vão levar um tempo de até 20 minutos. Será realizado exame de sangue onde será coletado 10 ml de sangue para a avaliação da IL-10 (anti-inflamatório), TNF alfa e o óxido nítrico (inflamatório), a coleta de sangue será um procedimento rápido de até 5 minutos, e será realizado pela equipe da enfermagem. Estas avaliações serão realizadas pré e após tratamento com o laser. Após as avaliações os participantes serão separados em 4 grupos sendo que o grupo 1 receberá um tratamento fictício com laser em baixo da língua, grupo 2 receberá tratamento real com laser em baixo da língua, grupo 3 receberá o tratamento fictício na região da artéria radial (pulso), e grupo 4 receberá o tratamento real na região da artéria radial (pulso). Todos os grupos vão realizar fisioterapia. É importante ressaltar que os participantes de todos os grupos devem continuar fazendo o tratamento medicamentoso. Para a aplicação do laser em baixo da língua, será utilizado um material plástico descartável cobrindo a caneta de aplicação, por questões de higiene. O tratamento, será realizado 2 vezes por semana totalizando 12 semanas consecutivas. Todos os participantes serão sorteados para fazer parte do grupo que receberá o tratamento real e o grupo que receberá o tratamento fictício. Se houver melhora nos grupos de tratamento com o laser, todos os participantes que forem sorteados para ficarem no grupo do tratamento fictício, receberão o tratamento real com a fotobiomodulação imediatamente após o término do estudo, para que não fique em desvantagem em relação ao outro grupo. Após o tratamento haverá acompanhado por 2 meses, e será necessário realizar novamente as avaliações.

5. Desconforto ou Riscos Esperados: Os riscos esperados são mínimos, pois você será avaliado e receberá o tratamento em um local fechado, com a presença somente de um familiar (se necessário) e do pesquisador para evitar qualquer tipo de

constrangimento. O pesquisador acompanhará você em todo trajeto a fim de evitar possíveis quedas. Explicará detalhadamente cada avaliação em que você participará e o tratamento que receberá, posicionando-o com cuidado. O pesquisador permanecerá durante toda a avaliação e a aplicação do laser com luvas descartáveis. A pessoa que coletará o seu sangue é habilitada a utilizar os procedimentos adequados para não haver riscos para o(a) sr(a). Entretanto, observamos que há a possibilidade de ocorrer riscos e desconfortos relacionados à coleta venosa, ainda que raros e passageiros, como dor localizada, raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Cuidados devem ser tomados para minimizar esses riscos.

6. Retirada do Consentimento: Retirada do Consentimento: o voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo.

7. Informações: O participante tem a garantia que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento de quaisquer dúvidas quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa. Também os pesquisadores citados assumem o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando.

8. Garantia do Sigilo: Os pesquisadores asseguram a privacidade dos participantes quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

9. Formas de Ressarcimento das Despesas decorrentes da Participação na Pesquisa: Não serão ressarcidas despesas com eventuais deslocamentos.

10. Local da Pesquisa: A pesquisa será desenvolvida nas Clínicas de Fisioterapia da UNINOVE, localizadas nos Campus do Memorial (Rua Dr. Adolfo Pinto, 109 – Barra Funda), Campus da Vila Maria (Rua Profa. Maria José Barone Fernandes, 300 – Vila Maria) e no Rua Vergueiro, 235/249 - Liberdade, São Paulo - SP, Brasil.

11. Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, que deve existir nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos participantes de pesquisas em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento das pesquisas dentro dos padrões éticos (Normas e Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa envolvendo Seres Humanos – Res. CNS nº 466/12). O Comitê de Ética é responsável pela avaliação e acompanhamento dos protocolos de pesquisa no que corresponde aos aspectos éticos.

Endereço do Comitê de Ética da Uninove: Rua. Vergueiro nº 235/249 – 12º andar - Liberdade – São Paulo – SP CEP. 01504-001 Fone: 3385-9197 comitedeetica@uninove.br

12. Nome Completo e telefones dos Pesquisadores (Orientador e Alunos) para Contato: : Profa. Dra. Sandra Kalil Bussadori (11) 98381-7453 ou Tamiris da Silva (11) 97676-4625.

13. Eventuais intercorrências que vierem a surgir no decorrer da pesquisa poderão ser discutidas pelos meios próprios.

São Paulo, de de .

15. Consentimento Pós-Informação:

Eu, _____, após leitura e compreensão deste termo de informação e consentimento, entendo que minha participação é voluntária, e que posso sair a qualquer momento do estudo, sem prejuízo algum. Confirmando que recebi uma via deste termo de consentimento, e autorizo a realização do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos somente neste estudo no meio científico.

Nome (por extenso): _____

Assinatura do Participante / Responsável

16. Eu, _____ (Pesquisador do responsável desta pesquisa), certifico que:

- a) Considerando que a ética em pesquisa implica o respeito pela dignidade humana e a proteção devida aos participantes das pesquisas científicas envolvendo seres humanos;
- b) Este estudo tem mérito científico e a equipe de profissionais devidamente citados neste termo é treinada, capacitada e competente para executar os procedimentos descritos neste termo;
- c) A resolução CNS nº 466/12 dispõe sobre as normas aplicáveis a pesquisas em Ciências Humanas e Sociais, cujo procedimentos metodológicos envolvam a utilização de dados diretamente obtidos com os participantes.

Tamiris da Silva
Assinatura do Pesquisador Responsável

1ª via: Instituição
2ª via: Voluntário

Anexo 2

Avaliação inicial

Data: __/__/____

Identificação

Nome: _____
 Idade: _____
 Endereço: _____
 Telefone: _____
 Diagnóstico médico: _____
 Médico responsável: _____
 Diagnóstico fisioterapêutico: _____
 EDSS: _____

HMA:

Antecedentes pessoais e familiares

Queixa principal

Objetivo funcional

Exames complementares/ Cirurgias

Medicamentos

Sinais vitais

PA: _____
 FC: _____
 FR: _____

AVD'S

Alimentação: Dependente Semi-dependente Independente

Higiene: Dependente Semi-dependente Independente

Vestuario: Dependente Semi-dependente Independente

Transferências: Dependente Semi-dependente Independente

Usa órtese: _____ Tipo: _____

SENSIBILIDADE Superficial (Tátil e dolorosa):

Profunda (cinético-postural):

REFLEXOS PROFUNDOS:

<i>Reflexos</i>	<i>Direito</i>	<i>Esquerdo</i>
Tricipital		
Bicipital		
Patelar		
Aquileu		

Força Muscular:

Grupos	Ombro		Cotovelo		Punho		Quadril		Joelho		tornozelo	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
Flexor												
Extensor												
Adutor												
Abdutor												
Rotador int												
Rotador Ext												

ADM

Grupos	Ombro		Cotovelo		Punho		Quadril		Joelho		Tornozelo	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
Flexor												
Extensor												
Adutor												
Abdutor												
Rot. Int												
Rot. Ext												

Tônus:

Grupos	Ombro		Cotovelo		Punho		Quadril		Joelho		Tornozelo	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
Flexor												
Extensor												
Adutor												
Abdutor												
Rot. Int												
Rot. Ext												

COORDENAÇÃO MOTORA

Obs

Index – Index	
Index- Nariz	
Index- dedo do examinador	
Prova do rechaço	
Calcanhar joelho	

Anexo 3

Escores da EDSS

Escores	Características	Escore Total
0	Exame neurológico normal (todos os SF grau 0; cerebral grau 1 aceitável)	
1,0	Sem incapacidade (1 SF grau 1)	
1,5	Sem incapacidade (2 SF grau 1)	
2,0	Incapacidade mínima em 1 SF (1 SF grau 2, outros grau 0 ou 1)	
2,5	Incapacidade mínima em 2 SF (2 SF grau 2, outros grau 0 ou 1)	
3,0	Incapacidade moderada em 1 SF (1 SF grau 3, outros grau 0 ou 1) ou incapacidade discreta em 3 ou 4 SF (3/4 SF grau 2, outros grau 0 ou 1). Deambulando plenamente.	
3,5	Deambulação plena, com incapacidade moderada em 1SF (1 SF grau 3) e 1 ou 2 SF grau 2; ou 2SF grau 3; ou 5 SF grau 2 (outros 0 ou 1)	
4,0	Deambulação plena, até 500 m sem ajuda ou descanso (1 SF grau 4, outros 0 ou 1)	
4,5	Deambulação plena, até 300 m sem ajuda ou descanso. Com alguma limitação da atividade ou requer assistência mínima (1 SF grau 4, outros 0 ou 1)	
5,0	Deambulação até 200 m sem ajuda ou descanso. Limitação nas atividades diárias (equivalentes são 1 SF grau 5, outros 0 ou 1; ou combinação de graus menores excedendo o escore 4.0)	
5,5	Deambulação até 100 m sem ajuda ou descanso. Incapacidade impedindo atividades plenas diárias (equivalentes são 1SF grau 5, outros 0 ou 1; ou combinações de graus menores excedendo o escore 4.0)	
6,0	Assistência intermitente ou com auxílio unilateral constante de bengala, muleta ou suporte (equivalentes são mais que 2 SF graus 3+)	
6,5	Assistência bilateral (equivalentes são mais que 2 SF graus 3+)	
7,0	Não anda 5 m mesmo com ajuda. Restrito a cadeira de rodas. Transfere da cadeira para cama (equivalentes são combinações com mais que 1 SF 4+, ou piramidal grau 5 isoladamente)	
7,5	Consegue apenas dar poucos passos. Restrito á cadeira de rodas. Necessita ajuda para transferir-se (equivalentes são combinações com mais que 1 SF grau 4+)	
8,0	Restrito ao leito, mas pode ficar fora da cama. Retém funções de autocuidado; bom uso dos braços (equivalentes são combinações de vários SF grau 4+)	
8,5	Restrito ao leito constantemente. Retém algumas funções de autocuidado e dos braços (equivalentes são combinações de vários SF grau 4+)	
9,0	Paciente incapacitado no leito. Pode comunicar, não come, não deglute (equivalentes é a maioria de SF grau 4+)	
9,5	Paciente totalmente incapacitado no leito. Não comunica, não come, não deglute (equivalentes são quase todos de SF grau 4+)	
10	Morte por esclerose múltipla	

Anexo 4

Escala de Impacto da Fadiga Modificada (MFIS)

Nome: _____

Data: _____

INSTRUÇÕES: Em seguida será apresentado um conjunto de afirmações sobre como a fadiga pode afetar uma pessoa. A fadiga é uma sensação de cansaço físico e perda de energia que muitas pessoas sentem de tempos em tempos. Por favor, leia cada afirmação cuidadosamente e desenhe um círculo em volta do número que melhor indique como a fadiga o tem afetado durante as 4 últimas semanas. Se necessitar de ajuda para marcar as respostas, peça ao entrevistador, indicando o número que melhor corresponde à sua resposta.

Por favor, responda a todas as questões. Se não tiver certeza sobre qual a resposta a selecionar, escolha aquela que estiver mais próxima daquilo que descreve o que tem vindo a sentir. O entrevistador poderá explicar algumas palavras ou frases que não compreenda. Por causa da minha fadiga durante as 4 últimas semanas....

	0 Nunca	1 Raro	2 Poucas vezes	3 muitas vezes	4 Sempre
1. Eu tenho estado menos alerta					
2. Eu tenho tido dificuldades em manter a atenção por longos períodos					
3. Eu tenho sido incapaz de pensar claramente.					
4. Eu tenho andado desastrado e descoordenado.					
5. Eu tenho andado esquecido.					
6. Eu tenho tido necessidade de me adequar nas minhas atividades físicas..					
7. Eu tenho estado menos motivado para fazer qualquer coisa que exija esforço físico.					
8. Eu tenho estado menos motivado para participar em atividades sociais.					

9. Eu tenho estado limitado para fazer minhas atividades fora de casa					
	0 Nunca	1 Raro	2 Poucas vezes	3 muitas vezes	4 Sempre
10. Eu tenho tido dificuldades em manter o esforço físico por períodos longos.					
11. Eu tenho tido dificuldades em tomar decisões					
12. Eu estado menos motivado para fazer algo em que requer pensar					
13. Estou sentindo fraqueza em meus músculos					
14. Eu tenho estado fisicamente desconfortável.					
15. Eu tenho tido dificuldades de terminar tarefas que requer esforço para pensar					
16. Eu tenho dificuldades em organizar meus pensamentos quando estou fazendo coisas em casa ou no trabalho					
17. Eu tenho estado menos capaz de completar tarefas que requerem esforço físico					
18. Meus pensamentos estão mais lentos					
19. Eu tenho tido dificuldades em me concentrar					
20. Eu tenho limitação em minhas atividades físicas					
21. Eu tenho precisado descansar com mais frequência ou por longos períodos					

Total: _____