

Francisco José Cidral Filho

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS FOTOBIOLOGICOS  
ENVOLVIDOS NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA  
TERAPIA POR DIODO EMISSOR DE LUZ EM  
CAMUNDONGOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Doutor em Neurociências na Área de Concentração de Neuropsicobiologia.  
Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Cidral Filho, Francisco José

Avaliação dos mecanismos fotobiológicos envolvidos na  
antinociceção induzida pela terapia por diodo emissor de  
luz em camundongos. / Francisco José Cidral Filho ;  
orientador, Adair Roberto Soares dos Santos -  
Florianópolis, SC, 2013.  
155 p.

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

Inclui referências

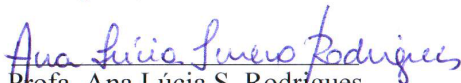
1. Neurociências. 2. Terapia por diodo emissor de luz.  
3. Fototerapia. 4. Dor. 5. Analgesia. I. Soares dos  
Santos, Adair Roberto . II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III.  
Título.

**FRANCISCO JOSÉ CIDRAL FILHO**


**“AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS FOTOBIOLOGICOS  
ENVOLVIDOS NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA  
PELA TERAPIA POR DIODO EMISSOR DE LUZ EM  
CAMUNDONGOS”.**

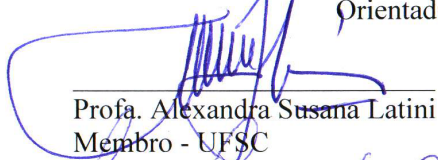
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de  
Doutor em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade  
Federal de Santa Catarina


Florianópolis, 02 de maio de 2013.

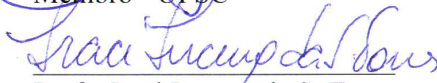
  
Profª. Ana Lúcia S. Rodrigues  
Coordenadora do Curso

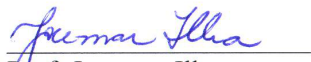
Banca Examinadora:


  
Prof. Adair Roberto S. dos Santos  
Orientador – UFSC

  
Profª. Alexandra Susana Latini  
Membro - UFSC

  
Profª. Ana Paula Casadei  
Membro - UFSC

  
Profª. Iraci Lucena da S. Torres  
Membro da Banca Externo

  
Prof. Jocemar Ilha  
Membro da Banca Externo

  
Prof. Odival Cezar Gasparotto  
Membro – UFSC



Este trabalho é dedicado a minha esposa Regiane, AMOR da minha vida.



## **AGRADECIMENTOS**

A minha esposa Regiane pelo seu amor, compreensão e constante incentivo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos pela oportunidade única que me proporcionou de poder realizar este trabalho. Agradeço muito pela sua orientação e acima de tudo pela sua amizade.

Aos meus colegas do laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI) pela amizade e incentivo. Um especial agradecimento aos que diretamente auxiliaram na execução deste trabalho: Ari Moré, Morgana da Silva e particularmente ao casal superdinâmico Daniel Martins e Leidiane Mazzardo-Martins, que muito me ajudaram durante essa jornada no doutorado.

Ao Prof. Dr. Eduardo Cargnin Ferreira pela contribuição nas análises histológicas deste trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro.





*“The mind that opens to a new idea never returns to its original size”.*

(Albert Einstein)

## RESUMO

A terapia por diodo emissor de luz (LEDT, do inglês *Light-Emitting Diode Therapy*) tem sido clinicamente utilizada como uma alternativa à terapia com laser de baixa intensidade (LLLT) no tratamento de lesões de tecidos moles, bem como no alívio da dor. No entanto, há uma carência de dados científicos sobre os possíveis mecanismos fisiológicos e moleculares responsáveis pelo efeito da LEDT no controle da dor de diferentes etiologias. Neste contexto, o presente estudo procurou avaliar a ação analgésica da LEDT em modelos de nocicepção aguda e crônica em camundongos, bem como investigar alguns dos possíveis mecanismos fotobiológicos envolvidos neste efeito. Na primeira série de experimentos os camundongos foram submetidos ao modelo de dor neuropática induzida por esmagamento do nervo isquiático (ENI). No sétimo dia pós-operatório, depois de determinar a dose analgésica (densidade de energia em Joules), a LEDT (950 nm, 80 mW/cm<sup>2</sup>, 2,5 J/cm<sup>2</sup>) foi irradiada, diariamente, durante um período de 15 dias, na pele sobre o local do esmagamento do nervo. Em comparação com o grupo controle (ENI), a LEDT reduziu a hipersensibilidade ao estímulo mecânico induzida pelo ENI, mas não acelerou a recuperação funcional motora nem a regeneração do nervo afetado. Na segunda série de experimentos, os camundongos foram submetidos ao modelo de dor pós-operatória induzida por incisão plantar (IP) e tratados com a LEDT (950 nm, 80 mW/cm<sup>2</sup> irradiância) em densidades de energia de 1 a 13 J/cm<sup>2</sup>. Os resultados demonstraram que o LEDT (950 nm, 80 mW/cm<sup>2</sup>), na densidade de energia de 9 J/cm<sup>2</sup>, apresentou os efeitos mais significativos contra a hipersensibilidade ao estímulo mecânico. Além disto, foi demonstrado que a atividade analgésica da LEDT envolveu (1) a ativação de receptores opioides periféricos com, ao menos em parte, a participação de opioides secretados por leucócitos recrutados para o sítio da lesão, (2) a ativação da via L-arginina/Óxido nítrico e, (3) a ativação periférica e central de receptores adenosinérgicos A<sub>1</sub> e canabinoides CB<sub>1</sub>, bem como de receptores CB<sub>2</sub> periféricos. Na terceira e última série de experimentos, os camundongos submetidos ao modelo da Síndrome da dor complexa regional do tipo I (SDCR-I) induzida por isquemia-reperfusão (IR) da pata foram tratados com a LEDT (950 nm de comprimento de onda, 80 mW/cm<sup>2</sup> irradiância, 9 J/cm<sup>2</sup>). Os resultados demonstram que a LEDT reduziu significativamente a hipersensibilidade aos estímulos mecânico e ao frio. Além disso, o tratamento com a LEDT aumentou os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, sem afetar os níveis das citocinas IL-1β, TNF-α e

IL-1ra; e por fim, a LEDT promoveu a redução dos níveis de marcadores do estresse oxidativo (carbonilação de proteínas e equivalentes MDA) e o restabelecimento do sistema antioxidante enzimático (enzimas superóxido dismutase e catalase). Em conjunto, estes resultados estendem dados da literatura sobre os mecanismos subjacentes ao efeito analgésico da terapia por diodo emissor de luz (LEDT) e sugerem que esta terapia pode ser um complemento útil para o tratamento da dor de diferentes etiologias.

**Palavras-chave:** Terapia por diodo emissor de luz. Analgesia. Dor neuropática. Dor pós-operatória. Síndrome da Dor Complexa Regional. Isquemia-reperfusão.

## ABSTRACT

Light-Emitting Diode Therapy (LEDT) has been clinically used as an alternative to low level laser therapy (LLLT) in the treatment of soft tissue injuries as well as in pain relief. Nevertheless, there is a lack of scientific data on the possible physiological and molecular mechanisms responsible for LEDT control of pain of different etiologies. In this context, the present study evaluated the analgesic activity of LEDT in mouse models of acute and chronic nociception, as well as investigated some of the possible photobiological mechanisms involved in this effect. In the first series of tests, mice were subjected to the sciatic nerve crush model (SNC) of neuropathic pain. On the seventh post-operative day, after determining analgesic dose (energy density in Joules), LEDT (950 nm, 80 mW/cm<sup>2</sup>, 2.5 J/cm<sup>2</sup>) was irradiated, daily for a period of 15 days, on the skin over the crush site. Compared to control (SNC) group, LEDT reduced mechanical hypersensitivity induced by SNC but failed to accelerate motor functional recovery and nerve regeneration. In the second round of tests, mice were subjected to the plantar incision (PI) model of postoperative pain and treated with LEDT (950 nm wavelength, 80 mW/cm<sup>2</sup> irradiance) in energy densities of 1 through 13 J/cm<sup>2</sup>. The results demonstrate that LEDT (950 nm, 80 mW/cm<sup>2</sup>) at the energy density of 9 J/cm<sup>2</sup> presented the most significant effects against mechanical hypersensitivity. Analyses of its mechanisms indicated that LEDT analgesic activity involves, (1) activation of peripheral opioid receptors with, at least in part, the recruitment of opioid-containing leukocytes to the PI site, (2) activation of the L-arginine/NO pathway and, (3) activation of peripheral and central adenosinergic A<sub>1</sub> and cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors, as well as peripheral CB<sub>2</sub> receptors. In the third and last round of tests, mice were submitted to the model of Complex Regional Pain Syndrome Type I induced by paw ischemia-reperfusion and treated with LEDT (950 nm wavelength, 80 mW/cm<sup>2</sup> irradiance, 9 J/cm<sup>2</sup>). The results indicate that LEDT significantly reduced the behavioral signs of mechanical and cold hypersensitivity. In addition, the treatment increased the levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10, without affecting (IL)-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-1ra levels; as well as decreased the levels of oxidative stress markers (protein carbonyls and MDA equivalents) and of the antioxidant enzymatic system (superoxide dismutase and catalase). Taken together, these results extend previous literature data on the mechanisms behind the analgesic effect of Low Level Light Therapy and suggest that this LEDT might be a useful complement to the treatment of pain of different

etiologies.

**Key-words:** Light-Emitting Diode Therapy. Analgesia. Neuropathic pain. Post-operative pain. Complex Regional Pain Syndrome. Ischemia-reperfusion.

## LISTA DE FIGURAS

|   |     |
|---|-----|
| Figura 1 – Mediadores periféricos de transdução da dor após a lesão tecidual.                             | 30  |
| Figura 2 – Ativação de receptores opioides.   | 33  |
| Figura 3 – Migração de leucócitos e liberação de opioides no tecido inflamado.                            | 35  |
| Figura 4 – Receptores adenosinérgicos.  | 37  |
| Figura 5 – Receptores canabinoides.   | 38  |
| Figura 6 – Modelos experimentais de dor neuropática.  | 43  |
| Figura 7 – Modelo de esmagamento do nervo isquiático.   | 44  |
| Figura 8 – Modelo de incisão plantar.   | 45  |
| Figura 9 – Modelo de isquemia-reperusão da pata.  | 49  |
| Figura 10 – LED e Junção P-N.   | 53  |
| Figura 11 – Aspectos físicos da luz irradiada por LASERs e LEDs.  | 56  |
| Figura 12 – Profundidade de penetração x comprimento de onda ( $\lambda$ ).                               | 58  |
| Figura 13 – Papel do óxido nítrico na fototerapia.  | 63  |
| Figura 14 – Índices funcional e estático do isquiático.   | 72  |
| Figura 15 – Análise morfométrica do nervo isquiático.   | 75  |
| Figura 16 – Efeito da LEDT na hipersensibilidade mecânica induzida pelo ENI.                              | 85  |
| Figura 17 – Efeito da LEDT na recuperação funcional do nervo isquiático.                                  | 86  |
| Figura 18 – Efeito da LEDT na regeneração nervosa.  | 87  |
| Figura 19 – Efeito da LEDT na hipersensibilidade mecânica induzida pela IP.                               | 89  |
| Figura 20 – Envolvimento do sistema opioide no efeito antinociceptivo da LEDT.                            | 91  |
| Figura 21 – Envolvimento de opioides liberados por leucócitos no efeito antinociceptivo da LEDT.          | 92  |
| Figura 22 - Envolvimento da via L-arginina/óxido nítrico no efeito antinociceptivo da LEDT.               | 93  |
| Figura 23 – Envolvimento do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo da LEDT.                     | 95  |
| Figura 24 – Envolvimento dos receptores A <sub>1</sub> adenosinérgicos no efeito antinociceptivo da LEDT. | 96  |
| Figura 25 – Envolvimento dos receptores CB <sub>1</sub> canabinoides no efeito antinociceptivo da LEDT.   | 98  |
| Figura 26 – Envolvimento dos receptores CB <sub>2</sub> canabinoides no efeito antinociceptivo da LEDT.   | 100 |
| Figura 27 – Efeito da LEDT na hipersensibilidade mecânica e ao frio induzida pela IR.                     | 102 |
| Figura 28 – Decurso temporal do efeito da LEDT na hipersensibilidade mecânica e frio induzida pela IR.    | 103 |
| Figura 29 – Efeito da LEDT sobre citocinas pró e anti-inflamatórias.                                      | 105 |
| Figura 30 – Efeito da LEDT no estresse oxidativo e sistema antioxidante.                                  | 106 |



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG - 2 araquidonil glicerol  
AC - adenilato ciclase  
ADP - difosfato de adenosina  
AEA - anandamida  
AINEs - anti-inflamatórios não esteroidais  
ANOVA - análise de variância  
ARs receptores de adenosina  
ATP - trifosfato de adenosina  
cAMP - monofosfato cíclico de adenosina  
CAT - catalase  
CB - canabinoides  
CBRs - receptores canabinoides  
CCI - lesão por constrição crônica do nervo isquiático  
CEUA - comitê de ética para o uso de animais  
cGMP - monofosfato de guanosina cíclico  
CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina  
CRH – Hormônio liberador da corticotropina  
DMSO - dimetil sulfoxida  
DNPH - dinitrofenilhidrazina  
DPCPX - 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina  
DRG - gânglio da raiz dorsal  
ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay  
ENI - esmagamento do nervo isquiático  
EPM - erro padrão da média  
ERK - quinase regulada por sinais extracelulares  
EROs - espécies reativas de oxigênio  
FAAH - amida hidrolase de ácidos graxos  
FDA - Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos  
GABA - ácido gama-aminobutírico  
GFAP - proteína glial fibrilar ácida  
GLU - glutamato  
GPx - glutathione peroxidase  
I.P. - intraperitoneal  
I.PL. - intraplantar  
I.T. - intratecal  
IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor  
IEC - Índice Estático do nervo Isquiático  
IFC - Índice Funcional do nervo Isquiático



IL - interleucina  
IL-1 $\beta$  - interleucina - 1 beta  
IP - incisão plantar  
IR - isquemia-reperfusão  
J - Joules  
JNK - quinase C jun n-terminal  
LEDT - Terapia por Diodo Emissor de Luz  
L-NAME - L-NG-Nitroarginina Metil Ester  
L-NOARG - N $\omega$ -nitro-L-arginina  
LASER - Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação  
LLLT - Low Level Laser Therapy  
MAPK - quinases ativadas por mitógenos  
MDA - malondialdeído  
mW/cm<sup>2</sup> - Microwatts por centímetro quadrado  
NASA - Agência Nacional Aeroespacial  
NF $\kappa$ B - fator de transcrição nuclear kappa B  
NO - óxido nítrico  
NPs - neuropatias periféricas  
PAG - substância cinzenta periaquedutal  
PEA - palmitoiletanolamida  
PI3K - fosfatidilinositol 3-quinase  
PL - distância do calcanhar ao topo do terceiro dedo  
PLC - fosfolipase C  
POMC - proopiomelanocortina  
PRGC - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina  
S.C. - subcutâneo  
SDCR - Síndrome da dor regional complexa  
SDCR-I - Síndrome da dor regional complexa do tipo I  
SNC - sistema nervoso central  
SNP - sistema nervoso periférico  
SOD - superóxido dismutase  
SP - substância P  
TBARS - espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico  
THC -  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol  
TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral-alfa  
TRPA1 - canal catiônico receptor de potencial transitório ankirina  
TS - distância entre o primeiro e quinto dedo

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>SUMÁRIO .....</b>  | <b>24</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                       | <b>27</b> |
| 1.1 DOR .....   | 27        |
| 1.2 SISTEMAS ENDÓGENOS NO CONTROLE DA DOR .....                 | 31        |
| <b>1.2.1 Sistema Opióide.....</b>                               | <b>31</b> |
| 1.2.1.1 Mecanismos da analgesia induzida por opioides .....     | 32        |
| 1.2.1.2 Opióides endógenos liberados por leucócitos.....        | 34        |
| <b>1.2.2 Sistema Adenosinérgico.....</b>                        | <b>35</b> |
| <b>1.2.3 Sistema Canabinoide.....</b>                           | <b>37</b> |
| 1.2.3.1 Canabinóides endógenos liberados por macrófagos .....   | 39        |
| 1.3 MODELOS DE DOR UTILIZADOS NESTE ESTUDO .....                | 40        |
| <b>1.3.1 Dor Neuropática.....</b>                               | <b>40</b> |
| <b>1.3.2 Dor Pós-operatória .....</b>                           | <b>44</b> |
| <b>1.3.3 Síndrome da Dor Complexa Regional .....</b>            | <b>47</b> |
| 1.3.3.1 Processo inflamatório no modelo da SDCR-I.....          | 49        |
| 1.3.3.2 Estresse oxidativo no modelo da SDCR-I .....            | 51        |
| 1.4 TERAPIA POR DIODO EMISSOR DE LUZ .....                      | 53        |
| <b>1.4.1 Mecanismos de Ação da Fototerapia .....</b>            | <b>59</b> |
| 1.4.1.1 Papel do óxido nítrico na fototerapia .....             | 61        |
| <b>1.4.2 Parâmetros Utilizados na Fototerapia .....</b>         | <b>63</b> |
| <b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>                                     | <b>65</b> |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>   | <b>67</b> |
| 3.1 OBJETIVO GERAL .....  | 67        |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                 | 67        |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                               | <b>68</b> |
| 4.1 ANIMAIS .....   | 68        |
| 4.2 MODELO DE ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO .....             | 68        |
| <b>4.2.1 Protocolo de Indução do Modelo.....</b>                | <b>68</b> |
| <b>4.2.2 Grupos Experimentais e Tratamento com a LEDT .....</b> | <b>69</b> |
| <b>4.2.3 Avaliação da Hipersensibilidade Mecânica .....</b>     | <b>70</b> |
| <b>4.2.4 Índices do Nervo Isquiático.....</b>                   | <b>70</b> |
| <b>4.2.5 Histologia e análise morfométrica .....</b>            | <b>72</b> |
| 4.2.5.1 Preparação das amostras .....                           | 72        |
| 4.2.5.2 Técnicas histomorfológicas .....                        | 73        |
| 4.2.5.3 Tratamento das imagens .....                            | 73        |
| 4.2.5.4 Morfometria .....                                       | 74        |
| 4.3 MODELO DE INCISÃO PLANTAR .....                             | 76        |
| <b>4.3.1 Protocolo de Indução do Modelo.....</b>                | <b>76</b> |
| <b>4.3.2 Grupos Experimentais e Tratamento com a LEDT .....</b> | <b>76</b> |
| <b>4.3.3 Avaliação da Hipersensibilidade Mecânica .....</b>     | <b>77</b> |
| <b>4.3.4 Envolvimento do Sistema Opióide.....</b>               | <b>77</b> |
| <b>4.3.5 Injeção Intratecal.....</b>                            | <b>78</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 4.3.6 Envolvimento de Opióides Liberados por Leucócitos .....                  | 78         |
| 4.3.7 Envolvimento da Via L-arginina/óxido nítrico .....                       | 78         |
| 4.3.8 Envolvimento do Sistema Adenosinérgico .....                             | 78         |
| 4.3.9 Envolvimento do Sistema Canabinóide .....                                | 79         |
| 4.4 MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO DA PATA .....                                | 80         |
| 4.4.1 Protocolo de Indução do Modelo .....                                     | 80         |
| 4.4.2 Grupos Experimentais e Tratamento com a LEDT .....                       | 80         |
| 4.4.3 Avaliação da Hipersensibilidade Mecânica .....                           | 81         |
| 4.4.4 Avaliação da Hipersensibilidade Térmica ao Frio .....                    | 81         |
| 4.4.5 Dosagem de Citocinas .....   | 82         |
| 4.4.6 Determinação do Estresse Oxidativo e Sistema Antioxidante .....          | 82         |
| 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....  | 83         |
| <b>5 RESULTADOS .....</b>  | <b>84</b>  |
| 5.1 MODELO DE ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO .....                            | 84         |
| 5.1.1 Efeito da LEDT na Hipersensibilidade Mecânica .....                      | 84         |
| 5.1.2 Efeito da LEDT na Recuperação Funcional .....                            | 85         |
| 5.1.3 Efeito da LEDT na Regeneração Nervosa .....                              | 86         |
| 5.2 MODELO DE INCISÃO PLANTAR .....  | 88         |
| 5.2.1 Efeito da LEDT na Hipersensibilidade Mecânica .....                      | 88         |
| 5.2.2 Envolvimento do Sistema Opióide .....                                    | 90         |
| 5.2.3 Envolvimento de Opióides liberados por Leucócitos .....                  | 91         |
| 5.2.4 Envolvimento da via L-arginina/óxido nítrico .....                       | 93         |
| 5.2.5 Envolvimento do Sistema Adenosinérgico .....                             | 94         |
| 5.2.6 Envolvimento do Sistema Canabinoide .....                                | 97         |
| 5.3 MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO DA PATA .....                                | 101        |
| 5.3.1 Efeito da LEDT na Hipersensibilidade Mecânica e ao Frio .....            | 101        |
| 5.3.2 Efeito da LEDT sobre Citocinas Pró e Anti-inflamatórias .....            | 104        |
| 5.3.3 Efeito da LEDT sobre o Estresse Oxidativo e o Sistema Antioxidante ..... | 105        |
| <b>6 DISCUSSÃO .....</b>   | <b>107</b> |
| 6.1 PARÂMETROS DA LEDT UTILIZADOS NESTE ESTUDO .....                           | 107        |
| 6.2 EFEITO DA LEDT NA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA PELO ENI .....                  | 108        |
| 6.2.1 Efeito da LEDT Sobre a Recuperação Funcional e Regeneração Nervosa ..... | 109        |
| 6.3 EFEITO DA LEDT NA DOR PÓS-OPERATÓRIA INDUZIDA PELA IP .....                | 110        |
| 6.3.1 Participação do Sistema Opióide .....                                    | 112        |
| 6.3.2 Participação dos Sistemas Adenosinérgico e Canabinoide .....             | 113        |
| 6.3.3 Participação da via L-arginina/óxido nítrico .....                       | 118        |
| 6.4 EFEITO DA LEDT NO MODELO DE SDCR-I INDUZIDA POR IR ...                     | 119        |
| 6.5 DURAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO DA LEDT .....                                 | 123        |
| <b>7 CONCLUSÕES FINAIS .....</b>   | <b>125</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>126</b> |



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOR

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês International Association for the Study of Pain) a dor pode ser definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”. Esta definição enfatiza que a dor é uma experiência complexa que inclui múltiplas dimensões (JULIUS; BASBAUM, 2001).

A capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e bem-estar de um organismo, uma vez que a sensação de dor nos alerta para lesão real ou iminente e ativa respostas adequadas de proteção (JULIUS; BASBAUM, 2001). Tal fato pode ser dramaticamente ilustrado pelo exemplo de indivíduos que sofrem de insensibilidade congênita à dor, em geral desencadeada por uma mutação no gene SCN9A, localizado no braço longo do par cromossômico 2, que expressa os canais de sódio sensíveis à voltagem NaV1.7 (MANFREDI et al., 1981). Como resultado desta insensibilidade para a dor, tais indivíduos não apresentam respostas comportamentais adequadas de proteção contra condições de perigo que podem muitas vezes ser fatais (BASBAUM et al., 2009). Assim, estes indivíduos apresentam uma redução não só na qualidade como também no seu tempo de vida.

Não obstante seu caráter comumente protetor, alterações da via da dor podem levar à hipersensibilidade, e em tais casos a dor perde sua utilidade como um sistema de alerta e em vez de aguda pode se tornar crônica e debilitante (JULIUS; BASBAUM, 2001). De fato, a dor crônica é o motivo mais frequente que leva indivíduos a buscarem tratamento de saúde (FOX; BERGER; FINE, 2000). Além disso, dados estatísticos indicam que a dor crônica é a causa mais comum de incapacidade a longo prazo, acometendo em torno de 1,5 bilhão de pessoas em todo o mundo, e como a população mundial envelhece, o número de pessoas que precisam de tratamento para dor cresce a cada ano (FOX; BERGER; FINE, 2000).

A nocicepção, por outro lado, se refere ao processo neural de decodificação e processamento de estímulos nocivos que envolvem diferentes etapas (BASBAUM et al., 2009), a saber:

- Transdução: que consiste na conversão da energia gerada por um estímulo nocivo de origem térmica, mecânica ou química

em potencial de ação pelos receptores sensoriais denominados de nociceptores;

- Transmissão: a transmissão dos sinais neurais a partir do local da transdução (periferia), para a medula espinal e encéfalo;
- Percepção: a assimilação dos sinais que chegam em estruturas superiores e é interpretada como dor;
- Modulação: impulsos descendentes inibitórios ou facilitadores que influenciam (modulam) a transmissão nociceptiva na medula espinal.

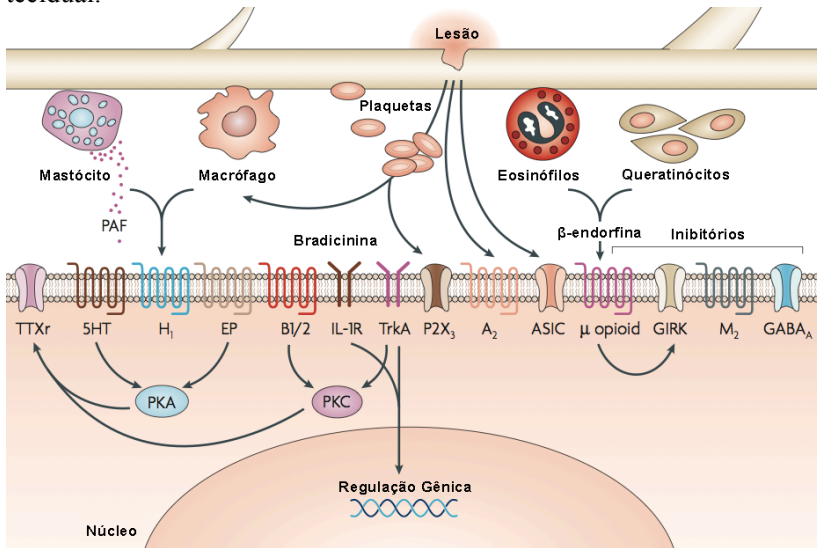
Historicamente, a modulação endógena da dor tem sido vista como a atenuação da transmissão no corno dorsal da medula espinal por estímulos descendentes inibitórios provenientes do encéfalo. A teoria de Melzack e Wall do “portão da dor” lançou esta ideia em 1965 (MELZACK; WALL, 1965). Atualmente está bem definido que a modulação endógena da dor pode ocorrer em todos os níveis do sistema nervoso, a saber, periféricamente, em receptores localizados em terminais nervosos; na medula espinal, em especial no corno dorsal da medula espinal; ou em sítios supra-espinais, sendo dependente do contexto da lesão, bem como de fatores endógenos.

Em terminais periféricos, diversos mediadores endógenos com efeitos pró- ou antinociceptivos podem ser liberados por células locais lesionadas, células do sistema imune ativadas, e até mesmo pelos queratinócitos da pele. Dentre os mediadores de efeito pró-nociceptivo está o fator de ativação plaquetária (PAF), as prostaglandinas, a bradicinina e citocinas pró-inflamatórias diversas, tais como a interleucina (IL)-1 $\beta$  e o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  (OPREE; KRESS, 2000). Em contrapartida, existem também vários mediadores com efeito antinociceptivo, dentre os quais se destacam as endorfinas, a adenosina, os endocanabinoides, e as citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, que contribuem para o equilíbrio dinâmico que existe entre a facilitação e a inibição da dor, tanto na periferia quanto no sistema nervoso central (SEIFERT et al., 2009; STEIN; MACHELSKA, 2011). (Fig. 1)

Da mesma forma, a modificação da transmissão sináptica no corno dorsal da medula espinal pode aumentar ou diminuir a transmissão de sinais nociceptivos para o encéfalo. Interneurônios inibitórios do corno dorsal liberam ácido gama-aminobutírico (GABA), glicina ou opioides modulando a transmissão em neurônios de projeção espinotalâmicos e espinobulbares (BASBAUM et al., 2009). Além disso, sistemas descendentes originários do tronco encefálico exercem

modulação nos estímulos nociceptivos na medula espinal (SEIFERT et al., 2009). Mais especificamente, o sistema inibitório descendente da dor é constituído principalmente por quatro componentes interligados, a saber, sistemas corticais e diencefálicos; a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e periventricular, que expressam grande quantidade de encefalinas e receptores opioides; porções do bulbo rostroventral, especialmente o núcleo magno da rafe (NMR) e núcleos adjacentes que recebem aferências da PAG e se projetam, por sua vez, para o corno dorsal da medula espinal e bulbo por meio de fibras serotoninérgicas e noradrenérgicas; e finalmente, o corno dorsal medular que recebe terminais de axônios do NMR e núcleos adjacentes (GEBHART, 2004). As fibras nervosas provenientes destas vias liberaram substâncias inibitórias (por exemplo, opioides endógenos, serotonina, noradrenalina e GABA) em sinapses com outros neurônios no corno da raiz dorsal. Estas substâncias ativam receptores específicos nos neurônios aferentes primários e inibem a transmissão nociceptiva. Acredita-se que a modulação endógena possa contribuir para a grande diferença de percepção de dor observada entre os pacientes que possuem lesões semelhantes (ARGOFF, 2011).

Figura 1 – Mediadores periféricos de transdução da dor após a lesão tecidual.



Fonte: Adaptado de Woodcock; Witter; Dionne (2007).

A lesão leva à liberação de numerosas substâncias químicas por mastócitos, macrófagos e células lesionadas que atuam direta ou indiretamente para alterar a sensibilidade de receptores metabotrópicos e de canais iônicos em terminais nervosos periféricos. Estes receptores liberam mensageiros secundários, tais como a proteína quinase A (PKA) e PKC que podem ativar outros receptores acoplados à membrana e/ou desencadear a transcrição gênica. A<sub>2</sub>, receptor adenosinérgico A<sub>2</sub>; ASIC, canal iônico sensível a ácidos; B1/2, receptores de bradicinina 1 e 2; SNC, sistema nervoso central; EP, receptor de prostaglandinas; GABA, ácido γ-aminobutírico; GIRK, canal para potássio retificador de entrada associado à proteína G; H<sub>1</sub>, receptor H<sub>1</sub> da histamina, 5-HT, 5-hidroxitriptamina; IL, interleucina; IL-1R, agonista do receptor de interleucina 1, M<sub>2</sub>, receptores muscarínicos M<sub>2</sub>, NO, óxido nítrico, P2X<sub>3</sub>, receptor X<sub>3</sub> purinérgico; PAF, fator de ativação plaquetária; PGs, prostaglandinas; ROS, espécies reativas de oxigênio; TNF, fator de necrose tumoral; TTXr, receptor tetrodotoxina; trkA, receptor de tirosina quinase A.



## 1.2 SISTEMAS ENDÓGENOS NO CONTROLE DA DOR

### 1.2.1 Sistema Opioide

O sistema opioide é um dos principais sistemas endógenos envolvidos em vários comportamentos fortemente conservados durante a escala evolutiva de organismos superiores, como a percepção da dor e seus mecanismos de modulação, o sistema de recompensa, de dependência e o controle do medo (LESNIAK; LIPKOWSKI, 2011).

Os peptídeos opioides endógenos são ligantes naturais que ativam diferentes receptores opioides durante eventos inflamatórios, neuropatias dolorosas ou câncer. Nos mamíferos três tipos de peptídeos opioides, endorfinas, encefalinas e dinorfinas, são sintetizados via clivagem de proteínas precursoras (COSTANTINO et al., 2012).

As endorfinas derivam da clivagem da proteína precursora proopiomelanocortina (POMC) e possuem afinidade pelos receptores  $\mu$  opioides. As encefalinas derivam da proteína precursora proencefalina (PENK) e possuem afinidade pelos receptores  $\mu$  e  $\delta$  opioides. As dinorfinas, por sua vez, derivam da clivagem da prodinorfina e exibem afinidade pelos receptores  $\kappa$  opioides (AKIL et al., 1998).

Os fármacos opioides são os analgésicos mais utilizados e eficazes para o tratamento de quadros de dor intensa, a morfina e o fentanil, por exemplo, estão entre os fármacos mais prescritas no mundo (AL-HASANI; BRUCHAS, 2011).

Os opioides exercem seus efeitos por meio da ativação de receptores opioides ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  e receptor do tipo opioide-1 - ORL-1) que são expressos em todo o circuito nociceptivo neural e em regiões críticas do sistema nervoso central, incluindo estruturas encefálicas relacionadas com a emoção e o sistema de recompensa (DHAWAN et al., 1996; COSTANTINO et al., 2012).

Cada receptor opioide é funcionalmente classificado em vários subtipos farmacológicos, embora genes específicos correspondentes a cada um destes subtipos de receptores ainda não tenham sido identificados (FENG et al., 2012).

Além da modulação da dor e da adição a fármacos, os receptores opioides participam amplamente de várias atividades fisiológicas e fisiopatológicas, incluindo a regulação da homeostase da membrana iônica, a proliferação celular, a resposta emocional, a função imune, o controle alimentar e a obesidade, em atividades dos sistemas respiratório e cardiovascular, bem como em alguns transtornos neurodegenerativos (MIZOGUCHI et al., 2012).

Embora os opioides sejam ainda os fármacos mais eficazes para o tratamento da dor severa, a sua utilização é cautelosa devido aos efeitos colaterais que incluem tonturas, depressão respiratória, náuseas, sedação, euforia ou disforia e prurido (KELLEY; TEPPER, 2012). Além disso, o uso prolongado de opioides conduz ao desenvolvimento de tolerância e dependência (COSTANTINO et al., 2012).

No entanto, nas últimas décadas estudos têm demonstrado que os opioides ativam não apenas receptores no encéfalo e medula espinal, mas também nos neurônios sensoriais periféricos. Portanto, abordagens específicas para analgesia opioide periférica oferecem uma alternativa interessante para o tratamento da dor por evitarem ou pelo menos minimizarem os efeitos adversos de opiáceos de ação central e de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (STEIN; LANG, 2009).

#### 1.2.1.1 Mecanismos da analgesia induzida por opioides

A analgesia desencadeada por opioides é mediada pela modulação de vias ascendentes (TAMBELI et al., 2002) e descendentes (FIELDS, 2004). Por conseguinte, os receptores opioides são expressos em gânglios da raiz dorsal, na medula espinal, e no núcleo trigeminal da via ascendente da dor, bem como em várias áreas do sistema nervoso central, incluindo aquelas envolvidas na modulação da dor, tais como os núcleos da PAG, núcleo magno da rafe, núcleos reticulares gigantocelulares e o núcleo accumbens (TAMBELI; PARADA, 2009).

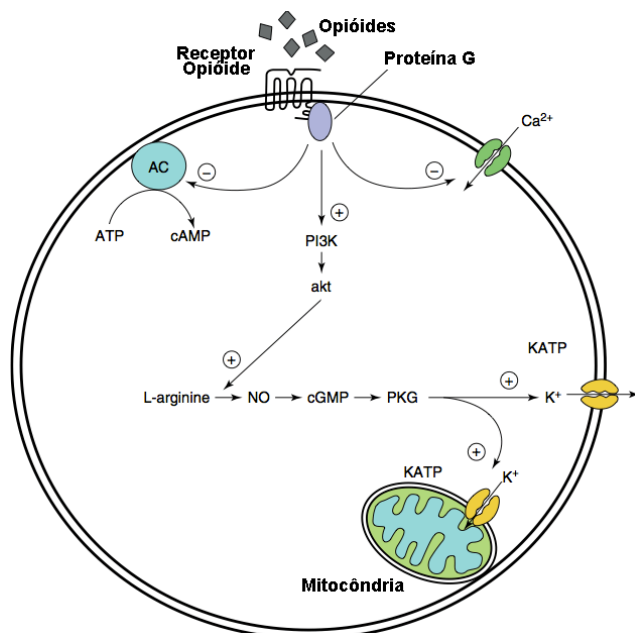
Nos terminais centrais, os opioides reduzem a liberação de neurotransmissores das fibras aferentes primárias nociceptivas bloqueando a transmissão sináptica, enquanto que na periferia, a ativação dos receptores opioides hiperpolariza diretamente os neurônios sensoriais e atenua a sensibilização do nervo ou a hiperexcitabilidade induzida por inflamação ou lesão de tecidos (HURLEY; HAMMOND, 2000).

Mais especificamente, os receptores opioides são receptores acoplados à proteína  $G_i/G_o$  que consistem em sete domínios hidrofóbicos transmembranares (I-VII). A ligação do opioide ao seu receptor ativa a proteína G acoplada resultando na dissociação de  $G_{i/o}$  do dímero  $G_{\beta\gamma}$ . A dissociação entre as subunidades inicia uma cascata de eventos intracelulares que medeiam o efeito antinociceptivo de opioides em neurônios aferentes primários. Estes eventos incluem a inibição da atividade da adenilato ciclase (AC), assim como de canais de  $Ca^{2+}$  do tipo N- e L- e da ativação da via óxido nítrico/L-arginina/monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) no tecido subcutâneo, canais de  $K^+$

dependentes de ATP e a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/AKT. (TAMBELI; PARADA, 2009) (Fig. 2).

Com base nestes mecanismos, quando utilizados para o controle da dor pós-operatória, a ativação de receptores opioides periféricos leva à diminuição da excitabilidade de neurônios aferentes primários que é induzida pela lesão de tecidos durante o procedimento cirúrgico e consequente desenvolvimento de inflamação com a liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios, tais como, a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (PRGC). Em particular, no tecido lesionado, estes eventos levam à antinocicepção e reduzem a inflamação (STEIN; LANG, 2009).

Figura 2 – Ativação de receptores opioides.



Fonte: Adaptado de Tambeli e Parada (2009).

Eventos intracelulares desencadeados pela ativação de receptores opioides. AC, adenilato ciclase; akt (PKB), proteína quinase B; ATP, trifosfato de adenosina; cAMP monofosfato cíclico de adenosina; cGMP, monofosfato cíclico de guanosina; KATP, canal de potássio sensível a ATP; NO, óxido nítrico; PI3K, fosfatidil inositol 3-quinase; PKG, proteína quinase G.

### 1.2.1.2 Opioides endógenos liberados por leucócitos

Tem sido demonstrado que o recrutamento de células imunes contendo peptídeos opioides para o local da inflamação pode reduzir a dor inflamatória em certas condições (MOUSA et al., 2002) (Fig. 3).

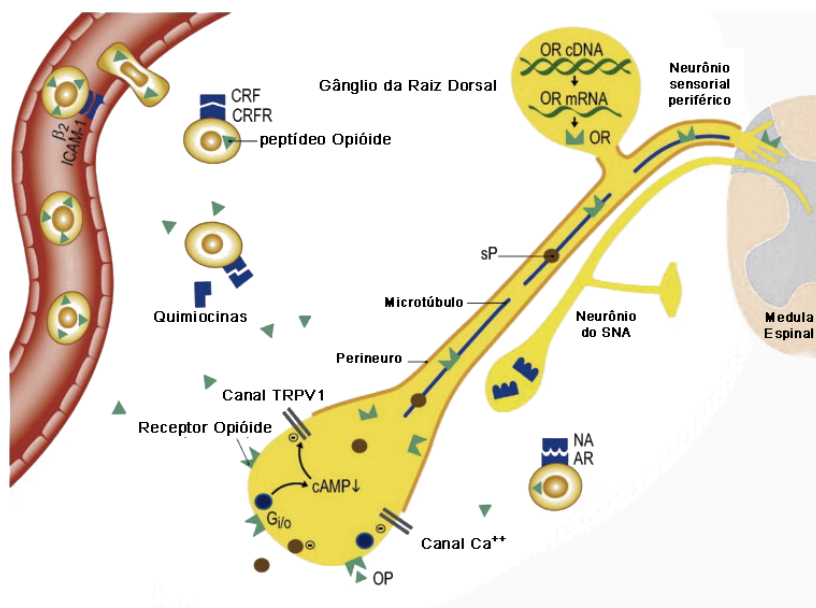
Em macrófagos, monócitos, granulócitos e linfócitos, a  $\beta$ -endorfina está presente em grânulos secretores dispostos na periferia da célula, pronta para exocitose (MOUSA et al., 2004). Contudo, sabe-se que a principal fonte de opioides endógenos ( $\beta$ -endorfina, encefalinas e dinorfina) são os leucócitos. Essas células expressam o precursor proopiomelanocortina da  $\beta$ -endorfina e possuem toda a maquinaria enzimática necessária para o processamento do peptídeo funcionalmente ativo (STEIN; MACHELSKA, 2011).

Assim, em resposta à inflamação, leucócitos dentre outras células imunes contendo opioides migram para os tecidos lesionados via moléculas de adesão e quimiocinas (CXCL1 e CXCL2/3). Em um segundo momento, estímulos estressores ou agentes de liberação, tais como o hormônio liberador de corticotropina (CRH) e a interleucina (IL)-1 $\beta$  (Fig. 3) estimulam a secreção destes peptídeos nos tecidos inflamados (Fig. 3). Uma vez secretados, tais peptídeos ativam os receptores opioides periféricos e produzem analgesia por (1) inibição da excitabilidade dos nervos sensoriais e/ou (2) pela inibição da liberação de neurotransmissores (RITTNER; MACHELSKA; STEIN, 2005).

O CRH está presente nas células do sistema imune, em fibroblastos e no endotélio vascular, e sua expressão é aumentada nos tecidos inflamados, tanto em animais como em humanos (SCHAFER; CARTER; STEIN, 1994). Já a IL-1 $\beta$  é uma citocina com uma vasta gama de atividades biológicas que é produzida por vários tipos de células incluindo macrófagos, fibroblastos e neutrófilos e se encontra aumentada durante os processos inflamatórios (LO et al., 1999). Adicionalmente, as quimiocinas (CXCL1 e CXCL2/3), além de recrutamento de células, podem estimular a secreção de peptídeos opioides a partir das células imunes (MACHELSKA, 2007).

Em resumo, o CRH, a IL-1 $\beta$ , as quimiocinas e catecolaminas agindo em seus respectivos receptores em leucócitos e outras células imunes desencadeiam a liberação de peptídeos opioides em resposta a um processo inflamatório, produzindo analgesia (Fig. 3) (MACHELSKA, 2007).

Figura 3 – Migração de leucócitos e liberação de opioides no tecido inflamado.



Fonte: Adaptado de Machelska (2007).

O recrutamento de células imunes contendo peptídeos opioides para o local da inflamação pode reduzir a dor inflamatória. AR, receptor adrenérgico; cAMP, monofosfato cíclico de adenosine; cDNA, DNA complementar; CRF, fator liberador de corticotrofina; CRFR, receptor do fator liberador de corticotrofina; mRNA, RNA mensageiro; NA, noradrenalina; OP, peptídeos opioides; OR, receptor opioide; sP, substância P; TRPV1, receptor de potencial transiente vanilóide 1.

### 1.2.2 Sistema Adenosinérgico

A adenosina é uma substância ubíqua expressa na maioria das células, incluindo neurônios e glia. Não obstante o fato que a adenosina possa funcionar como um neurotransmissor em algumas áreas encefálicas (MORI et al., 2001), ela não é armazenada nem liberada como um neurotransmissor clássico, uma vez que não se acumula em vesículas sinápticas, sendo transportada do citoplasma para o espaço extracelular por meio de um transportador de nucleosídeos (RIBEIRO; SEBASTIÃO; DE MENDONÇA, 2002).

Desta forma, a adenosina funciona como uma molécula de sinalização extracelular, influenciando a transmissão sináptica, modulando a atividade do sistema nervoso; pré-sinápticamente, inibindo ou facilitando a liberação de neurotransmissores e pós-sinápticamente, hiperpolarizando ou despolarizando neurônios e/ou exercendo ainda efeitos não-sinápticos (por exemplo, em células da glia). A adenosina, portanto, pertence ao grupo dos neuromoduladores (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009).

Existem quatro subtipos conhecidos de receptores de adenosina (ARs) denominados de  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$  - cada um dos quais tem um perfil farmacológico e distribuição únicos; entretanto, todos os quatro subtipos são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G (JACOBSON; GAO, 2006).

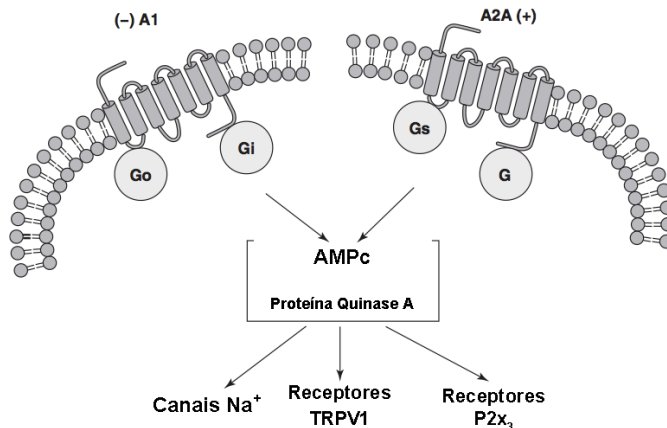
Os  $A_1$ Rs são expressos em níveis elevados no encéfalo, coração, tecido adiposo, estômago, canal deferente, testículos, baço, rim, aorta, fígado, olhos e bexiga. Os  $A_{2A}$ Rs são altamente expressos no estriado, núcleo acumbens e tubérculo olfatório. Além disso, foram encontrados níveis de expressão elevados e intermediários também em células do sistema imune, vasos pulmonares, coração e sangue. Os  $A_{2B}$ Rs, por sua vez, são geralmente expressos em níveis baixos em quase todos os tecidos. E por último, os  $A_3$ Rs têm sido detectado em vários tecidos, incluindo nos testículos, pulmão, rim, placenta, coração, cérebro, baço, fígado, útero, bexiga, jejuno, aorta, cólon ascendente e olhos (DIXON et al., 1996).

Nas células, a ativação de receptores de adenosina  $A_1$  e  $A_3$  (ARs) inibe a atividade da adenilato ciclase por meio da ativação de proteínas  $G_i$  sensíveis à toxina pertussis e resulta em aumento da atividade da fosfolipase C (PLC), por meio da subunidade  $G_{\beta\gamma}$ . A ativação dos receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  aumenta a atividade da adenilato ciclase por meio da ativação das proteínas  $G_s$ . Todos os quatro subtipos de ARs podem se acoplar à proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), dando-lhes um papel no crescimento, sobrevivência, morte e diferenciação celular (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009).

Com relação ao seu efeito analgésico ou pro-algésico, sabe-se que tanto na periferia como na medula espinal, a liberação de adenosina inibe a transmissão do estímulo nociceptivo dor por efeitos mediados pelos receptores  $A_1$  (SAWYNOK; LIU, 2003). Os receptores  $A_{2A}$ , por outro lado, em geral levam à facilitação da transmissão do estímulo nociceptivo (Fig. 4). Além disso, o aumento dos níveis periféricos de adenosina contribuem para os efeitos anti-inflamatórios de certos agentes terapêuticos (metotrexato, sulfasalazina, salicilatos), e tais

efeitos são principalmente mediados por receptores de adenosina  $A_{2A}$  (BURNSTOCK, 2009).

Figura 4 – Receptores adenosinérgicos.



Fonte: Sawynok e Liu (2003).

Contribuição dos receptores adenosinérgicos na sinalização nociceptiva em terminações nervosas de neurônios sensoriais periféricos.  $A_1$ , receptor adenosinérgico  $A_1$ ;  $A_{2A}$ , receptor adenosinérgico  $A_{2A}$ ; AMPc, monofosfato cíclico de adenosina; G, proteína G;  $G_o$ , proteína G inespecífica;  $G_i$ , proteína G inibitória;  $G_s$ , Proteína G estimulatória; TRPV1, receptor de potencial transiente vanilóide 1.

O desenvolvimento de potentes agonistas e antagonistas seletivos de ARs tem sido objeto de investigação por mais de três décadas (GAO et al., 2005). Entretanto, embora estudos pré-clínicos sugiram que os moduladores seletivos de ARs sejam promissores para inúmeras aplicações terapêuticas, incluindo doenças cardiovasculares, inflamatórias e neurodegenerativas, na prática clínica este objetivo não tem sido atingido. Uma razão para isso é a ubiquidade dos ARs e a possibilidade de efeitos secundários. Desta forma esta classe de fármacos permanece ainda no campo experimental (JACOBSON; GAO, 2006).

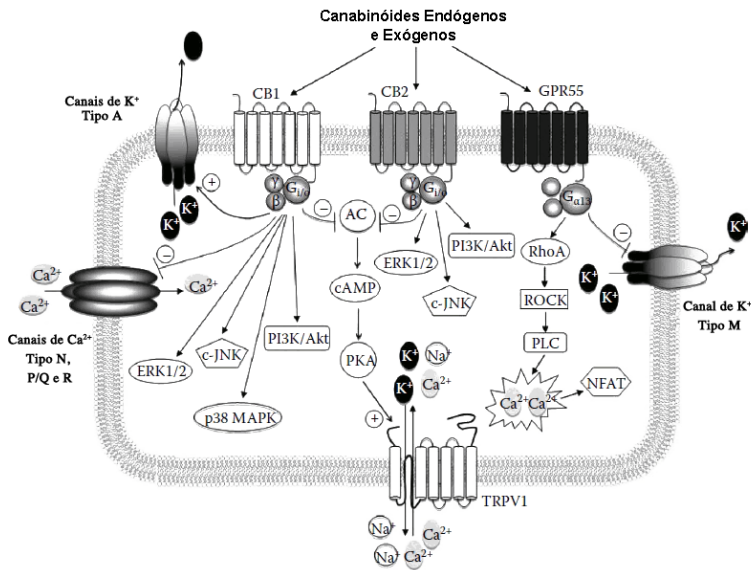
### 1.2.3 Sistema Canabinoide

O sistema canabinoide consiste de receptores canabinoides (CB) e os seus ligantes endógenos. Dois receptores identificados como  $CB_1$  e

CB<sub>2</sub> e possivelmente um terceiro, CPR55, foram clonados até o momento (STEIN; MACHELSKA, 2011) (Fig. 5). Entre os ligantes endógenos, N-araquidonoiletanolamina (anandamida ou AEA) e 2-araquidonoil glicerol (2-AG) são os mais estudados. Ambos são sintetizados por enzimas a partir de precursores poliinsaturados de ácidos graxos em resposta ao influxo ou mobilização de estoques intracelulares de Ca<sup>2+</sup> (AGARWAL et al., 2007; ANAND et al., 2009).

Ambos os receptores e seus ligantes endógenos estão distribuídos entre as principais vias de modulação da dor do sistema nervoso, incluindo o encéfalo, a medula espinal e os neurônios sensoriais periféricos (STEIN; MACHELSKA, 2011).

Figura 5 – Receptores canabinoides.



Fonte: Spigelman (2010).

\*AC: ciclase de adenilil; Akt: proteína quinase serina/treonina; ERK: quinase regulada por sinal extracelular; MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos; c-JNK: quinase c-Jun N-terminal; NFAT: fator nuclear ativado por células T; PI3K: fosfatidil inositol 3 quinase; PKA: proteína quinase A; PLC: Fosfolipase C; RhoA: Ras homologous gene A; ROCK, proteína quinase associada a Rho.



Semelhantes aos receptores opioides, os receptores CBs pertencem à família de receptores com sete domínios transmembranas acoplados à proteína  $G_i$ . Sua ativação leva à inibição da adenilato ciclase e consequente redução da produção de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) (AGARWAL et al., 2007).

Tem sido bem estabelecido que os endocanabinoides possuem a capacidade de afetar a percepção da dor em sítios supra-espinal, espinal e periféricos (WALKER; HOHMANN, 2005). Além disso, os endocanabinoides estão envolvidos em diferentes funções fisiológicas e patológicas, tais como a regulação da ingestão alimentar, a imunomodulação, a inflamação, o comportamento aditivo e a epilepsia entre outras (PIOMELLI, 2005).

Historicamente, a maconha ou *Cannabis sativa* tem sido utilizada para fins recreativos e tem a distinção de ser a droga com o maior registro histórico de uso humano (TALWAR; POTLURI, 2011). Enquanto a maconha é ilícitamente utilizada para fins recreativos, os extratos da planta têm sido utilizados desde os tempos antigos pelo seu valor medicinal e por suas propriedades psicoativas. Além disso, os canabinoides são analgésicos bem conhecidos, especialmente no que se refere ao controle da dor de origem somática (FOX; BEVAN, 2005).

Nos últimos anos os canabinoides têm surgido como uma alternativa atraente ou até mesmo como complemento à terapia com opioides para estados de dor crônica (PIOMELLI, 2005). Contudo, em humanos, a ativação de receptores canabinoides está associada a efeitos psicotrópicos indesejados, como a dependência, a tolerância e a deterioração da memória que surge devido ao efeito dos canabinoides nos circuitos prosencefálicos (PACHER; BATKAI; KUNOS, 2006). Para a exploração clínica das propriedades analgésicas dos canabinoides, um grande desafio é conceber estratégias que possam reduzir ou eliminar seus efeitos adversos sobre os aspectos cognitivo, afetivo e funções motoras, sem afetar seus efeitos analgésicos (TALWAR; POTLURI, 2011).

#### 1.2.3.1 Canabinoides endógenos liberados por macrófagos

De forma semelhante ao que ocorre em neurônios, uma via biossintética de endocanabinoides foi descrita em células do sistema imune (principalmente macrófagos), tendo sido demonstrado que tanto linhagens de macrófagos quanto macrófagos nativos, produzem e secretam anandamida em resposta a ionóforos de  $Ca^{2+}$ , lipopolissacarídeos, fator de ativação plaquetária e à própria anandamida

(STEIN; MACHELSKA, 2011).

Além da anandamida, monócitos/macrófagos, mastócitos e basófilos produzem e liberam palmitoiletanolamida (PEA). O PEA não pode ser estritamente considerado um endocanabinoide clássico porque não possui afinidade pelos receptores de canabinoides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, no entanto, a presença de PEA parece aumentar a atividade da anandamida (JONSSON et al., 2001).

Finalmente, foi demonstrado que o 2-AG pode ser produzido e secretado a partir de macrófagos nativos em resposta a lipopolissacarídeos e/ou fator de ativação plaquetária (DI MARZO, 2009). Não obstante esses achados, pouco se sabe sobre a contribuição dos endocanabinoides derivados de células imunes na modulação da dor.

### 1.3 MODELOS DE DOR UTILIZADOS NESTE ESTUDO

#### 1.3.1 Dor Neuropática

De acordo com a IASP, a dor neuropática é desencadeada como consequência direta de lesão ou doença que afeta o sistema somatosensorial (LOESER; TREEDE, 2008). Em outras palavras, a dor neuropática resulta de lesão ou disfunção do sistema nervoso.

A dor de origem neuropática é relativamente comum, com incidência estimada na população mundial em torno de 1 a 3% (DWORKIN et al., 2003; IRVING, 2005), principalmente pelo fato de acompanhar uma grande gama de patologias e disfunções que incluem trauma, inflamação, doenças metabólicas (por exemplo, diabetes), infecções (por exemplo, herpes zoster), tumores e doenças neurológicas primárias (BOUHASSIRA et al., 2008). A dor neuropática pode ser contínua ou episódica e é percebida de várias maneiras, como por exemplo, queimação, formigamento, em picadas, tipo choque elétrico, na forma de espasmo ou frio (FINNERUP et al., 2005).

A dor neuropática é geralmente crônica e incapacitante, sendo muitas vezes resistente ou pouco responsiva a AINES e opioides, no entanto, pode responder a fármacos antiepiléticos, antidepressivos, ou anestésicos (DWORKIN et al., 2003; ATTAL et al., 2010). Entretanto, estes fármacos apresentam limitada eficácia e/ou significativos efeitos adversos que comprometem sua utilização por período prolongado (BARON, 2009).

A sequência de eventos que pode ocorrer no nervo após a indução da lesão (SAADE; JABBUR, 2008) incluem: (1) produção de disparos nervosos ocasionados pela lesão, que podem se estender por um longo

período de tempo; (2) liberação de neuropeptídeos e outros mediadores pró-inflamatórios no local da lesão bem como no sistema nervoso central (SNC); (3) sensibilização de nociceptores e ativação de nociceptores silenciosos por meio da liberação de mediadores inflamatórios ou expressão de novos receptores ou canais iônicos; (4) mudanças na expressão gênica e na expressão de diversos peptídeos e receptores; (5) crescimento anormal de fibras nervosas periféricas e centrais; (6) mudanças nos campos receptivos de fibras nervosas periféricas lesionadas e intactas.

Além disso, um estado de dor crônica pode se estabelecer quando alterações patofisiológicas propagam a dor de forma independente do estímulo deflagrador (KONTINEN; MEERT, 2002). Desta forma, a lesão do nervo pode levar ao desenvolvimento de alterações no sistema nervoso central que podem persistir indefinidamente. Tais alterações incluem: mudanças nos campos receptivos das áreas periféricas no corno dorsal acompanhadas de diminuição da inibição pré-sináptica, fatos estes que sugerem mudanças importantes no processamento das informações sensoriais no corno dorsal; além do desencadeamento de uma cascata de eventos no segmento correspondente da coluna vertebral ou núcleo do trigêmeo, que começa instantaneamente e perdura por períodos de tempo variáveis, dependendo do tipo, extensão e reversibilidade do dano resultante. Ocorrem ainda mudanças importantes na expressão fenotípica e síntese de neurotransmissores e neuropeptídeos, como por exemplo, uma redução na liberação do GABA e no número de receptores GABAérgicos; mudanças na localização e/ou expressão de receptores para a substância P, para bradicinina, para opioides, para serotonina e ainda de transportadores de glutamato (KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009).

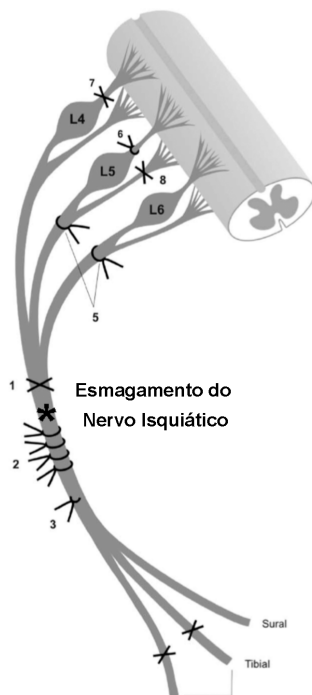
Além disso, a dor neuropática periférica pode ser induzida não apenas pela lesão direta de neurônios aferentes e seus ramos axonais, mas também indiretamente, pelo aumento na expressão e liberação de moléculas sintetizadas por células gliais e imunes durante a degeneração walleriana distal à lesão do nervo. Tais moléculas incluem citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10), fatores neurotróficos (BDNF, GDNF, NGF e NT-3) e quimiocinas (CXCL1 e CXCL2/3) dentre outras (KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009). Estas moléculas parecem estar envolvidas na iniciação de estados de dor neuropática além de serem capazes de influenciar diretamente a excitação dos neurônios aferentes e seus axônios (XIAO et al., 2002; SORKIN; YAKSH, 2009).

Desta forma, devido ao aumento da atividade espontânea e sensibilização dos neurônios do corno dorsal da medula após trauma ou

lesão dos tecidos periféricos e nervos, a sensibilização central explica por que a dor neuropática é muitas vezes desproporcional ao estímulo; como no caso da hiperalgesia e alodinia; ou ainda ocorrendo quando nenhum estímulo identificável existe, como no caso de dor persistente ou em propagação (KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009). Neste contexto, a hiperalgesia pode ser definida como resposta aumentada a estímulos nocivos; para a dor evocada por estímulos que normalmente não são dolorosos, o termo alodinia é preferido (SANDKUHLER, 2009).

Atualmente, há uma grande variedade de modelos animais úteis para o estudo da dor neuropática associada a diversas etiologias e relacionada a um quadro extenso de manifestações clínicas de neuropatias periféricas (SORKIN; YAKSH, 2009). Assim, a dor neuropática pode ser induzida por lesão mecânica (secção; esmagamento ou compressão), química, metabólica ou imunológica dirigida ao nervo, gânglio ou medula espinal. A figura 6 demonstra as lesões especificamente geradas por trauma físico do nervo periférico (KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009).

Figura 6 – Modelos experimentais de dor neuropática.



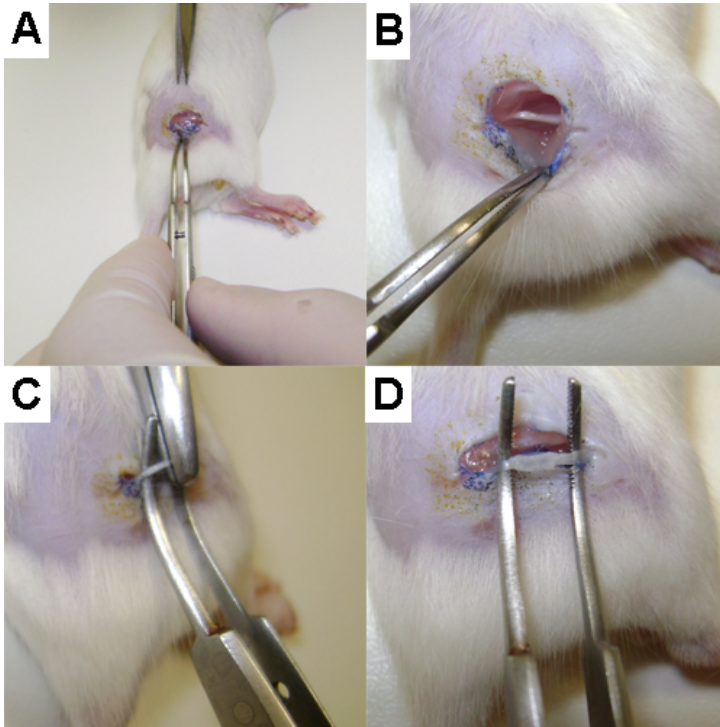
Fonte: Adaptado de Klusakova e Dubovy (2009).

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

O modelo do esmagamento do nervo isquiático (ENI - Fig. 7) utilizado neste estudo é decorrente de uma lesão física (por esmagamento) dirigida ao nervo (KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009). Neste modelo a estrutura do nervo é preservada ao menos em parte, facilitando a regeneração e seu estudo, bem como a avaliação da hipersensibilidade aos estímulos mecânico e térmico que em estudos

translacionais são sinais considerados como representativos da dor neuropática observada em humanos (KONTINEN; MEERT, 2002). Finalmente, este modelo é de fácil execução e alta reprodutibilidade (BRIDGE et al., 1994) exigindo o mínimo de conhecimento de técnica microcirúrgica e de instrumental e com reduzido custo de material (BOCCABELLA et al., 1964).

Figura 7 – Modelo de esmagamento do nervo isquiático.



Fonte: Próprio autor (2013).

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

### 1.3.2 Dor Pós-operatória

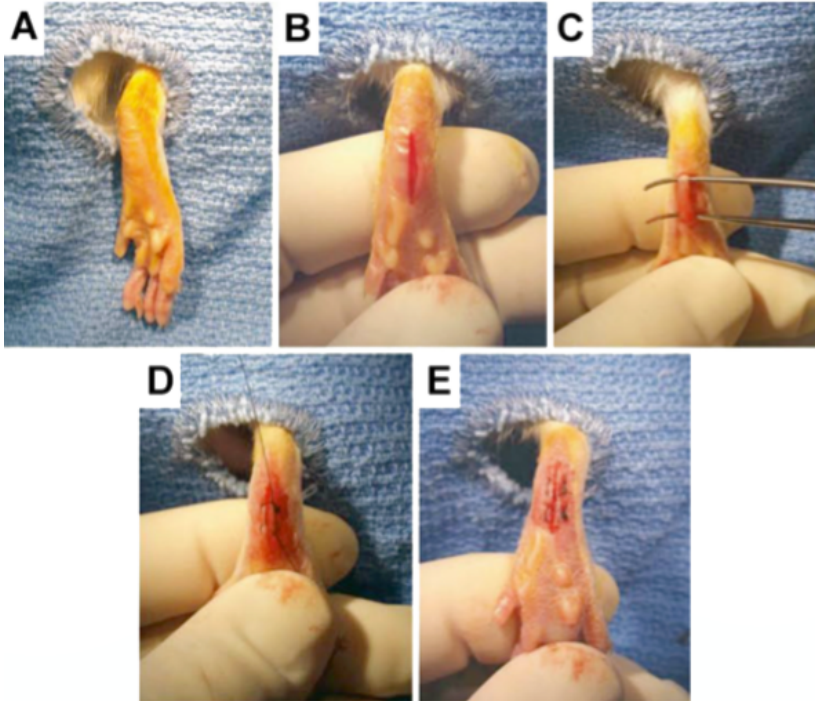
Mais de 73 milhões de cirurgias são realizadas anualmente apenas nos Estados Unidos e, de acordo com pesquisas demonstradas pelo Centro Nacional de Estatísticas em Saúde (NCHS, do inglês *National*

*Center for Health Statistics*), até setenta e cinco por cento dos pacientes sentem dor após o procedimento cirúrgico (COUSINS; POWER; SMITH, 2000). No Brasil não há dados exatos, entretanto, o país é o segundo no ranking mundial de cirurgias plásticas, com mais de 1,7 mil anualmente, ou 71 operações estéticas a cada hora (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2011).

Estima-se que o encargo econômico do tratamento da dor crônica que se desenvolve a partir da dor aguda em um indivíduo na faixa etária de 30 anos, ao longo da vida, poderia ser de aproximadamente 1 milhão de dólares (WRIGHT; SLUKA, 2001). Assim, a prevenção e o alívio eficaz na dor aguda podem melhorar o desfecho e evitar complicações clínicas, economizar recursos destinados à saúde e melhorar a qualidade de vida dos indivíduos atingidos.

O controle da dor pós-operatória é problemático porque os tratamentos atuais têm eficácia limitada, sendo que muitos pacientes sentem dor moderada a grave, especialmente no decorrer de atividades cotidianas (CHAORAN WU, 2011). Os fármacos opioides são usados, mas podem causar muitos efeitos colaterais, incluindo náusea, sedação e depressão respiratória; bloqueios locais com anestésicos são de curta duração e o uso de AINs pode também ser problemático (BALLANTYNE et al., 1998). A fim de se reduzir a morbidade peri-operatória e os custos de saúde, é fundamental melhorar o manejo da dor pós-operatória. Para tanto, é necessário uma melhor compreensão dos mecanismos da dor pós-cirúrgica, bem como o desenvolvimento de terapias eficazes que possam atuar de forma isolada ou complementar aos tratamentos tradicionais a fim de auxiliar no combate à dor bem como promover uma melhor qualidade de vida aos pacientes.

Devido às limitações dos métodos experimentais inerentes ao estudo da dor cirúrgica em seres humanos, modelos animais de dor pós-operatória aguda devem ser considerados como uma alternativa que pode ajudar a investigar a patogênese e melhorar as opções do seu tratamento (ALONZO; BAYER, 2002). Recentemente, diversos modelos animais de dor pós-operatória têm sido desenvolvidos, dentre os quais se destaca o modelo de incisão plantar (IP) desenvolvido por Brennan e colaboradores (1996) para ratos e adaptado para camundongos por Pogatzki e Raja (2003) (Fig. 8).  
Figura 8 – Modelo de incisão plantar.



Fonte: Adaptado de Wu (2011).

(A) Preparação antes da incisão. (B) uma incisão de 1 cm longitudinal é feita por meio da pele e fâscia começando a 0,5 cm da borda proximal do calcanhar e se estendendo em direção ao meio da pata. (C) O músculo flexor subjacente é elevado. (D) Sutura com fio de nylon 5-0. (E) A incisão concluída.

Neste modelo, as respostas nociceptivas mimetizam a dor pós-operatória em seres humanos (BRENNAN; ZAHN; POGATZKI-ZAHN, 2005), sendo que a incisão que envolve a pele, a fâscia e o músculo induz comportamento de dor espontânea em resposta a estímulos não-nocivos (alodinia) e resposta aumentada a estímulos nocivos (hiperalgesia), da mesma forma que em humanos (RICHMOND; BROMLEY; WOOLF, 1993). A hipersensibilidade aos estímulos mecânico e térmico que se desenvolve na área da incisão deve-se a adaptações/modificações do sistema nociceptivo (ZAHN; BRENNAN, 1999). A sensibilização da fibra aferente primária que ocorre no local da incisão é acompanhada de alterações na zona de facilitação dos neurônios no corno dorsal da medula espinal (ZAHN;



BRENNAN, 1999), caracterizando o processo de sensibilização central. A hipersensibilidade primária, que ocorre no local da incisão é provavelmente devido à sensibilização periférica, enquanto que a hipersensibilidade secundária observada no tecido não danificado que cerca o local da incisão é devido à sensibilização central (RICHMOND; BROMLEY; WOOLF, 1993). Assim, a dor induzida pela incisão cirúrgica que resulta de lesões da pele, fâscia, músculos e pequenas inervações desses tecidos, tem mecanismos comuns: lesão direta, inflamação e liberação de mediadores químicos que sensibilizam terminais nociceptivos periféricos para estímulos térmicos e mecânicos, tais como serotonina e histamina liberadas pelo processo de degranulação de mastócitos decorrente da incisão cirúrgica (OLIVEIRA et al., 2011). Além disso, Pogatzki e colaboradores (2003) mostraram que fibras A-delta e fibras C são sensibilizadas pela incisão e que a ativação de nociceptores silenciosos mecânicos tem um papel na manutenção da hipersensibilidade após a incisão.

### **1.3.3 Síndrome da Dor Complexa Regional**

A Síndrome da dor regional complexa (SDCR) é uma das mais desafiadoras condições de dor crônica em humanos que acomete os membros. Há pouco consenso no que diz respeito à etiologia, os sintomas, o quadro clínico, o diagnóstico ou o tratamento da SDCR. Historicamente, a SDCR foi descrita por uma série de condições que incluem a causalgia, atrofia Sudeck, distrofia simpática reflexa (DSR), dentre outras. A fim de uniformizar o diagnóstico para esta patologia, a IASP, em 1994, introduziu o termo SDCR para descrever uma ampla variedade de condições pós-traumáticas de dor neuropática dos membros (SEBASTIN, 2011).

A síndrome da dor complexa regional pode ser definida como uma síndrome dolorosa pós-traumática que pode incluir edema e modificações tróficas (STANTON-HICKS et al., 1995). O termo SDCR foi cunhado por se tratar de um tipo de dor complexa, que pode apresentar características clínicas variadas tais como edema, atividade vasomotora com mudança de coloração do membro, hiperidrose, distonia, hipotrofia muscular e osteopenia. É denominada de “regional” pois, na maioria dos casos, a síndrome envolve apenas uma região do corpo, geralmente uma extremidade, podendo, entretanto, se espalhar para diferentes áreas do corpo.

A SDCR em geral tem início após um trauma, geralmente em uma extremidade. Este trauma pode ser uma fratura distal, lesão

nervosa, lesão pós-cirúrgica, constrição do membro, síndromes de compressão nervosa, infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, infecção, injeções ou tumores (FELIU; EDWARDS, 2010).

A síndrome se subdivide em dois tipos, a do tipo I (SDCR-I) que é uma síndrome de dor crônica que é decorrente de lesões como entorses, fraturas e esmagamento e não é acompanhada por uma lesão do nervo clinicamente verificada (STANTON-HICKS et al., 1995). A do tipo II, também conhecida como causalgia, se difere do tipo I justamente por apresentar lesão nervosa, mesmo que parcial (FELIU; EDWARDS, 2010).

A SDCR é uma doença relativamente rara, com uma incidência estimada de 26,2 por 100.000 indivíduos (DE MOS et al., 2007). Entretanto, a SDCR é reconhecidamente de difícil tratamento, apesar dos vários métodos disponíveis, incluindo a terapia física, corticosteróides, bloqueio simpático, e anti-inflamatórios não-esteroides (ROBINSON; SANDOM; CHAPMAN, 2004), por conseguinte, o estudo de terapias para complementar o seu tratamento é clinicamente relevante.

O modelo de dor crônica pós-isquemia (Fig. 9) tem sido amplamente utilizado como modelo animal de síndrome da dor complexa regional do tipo I (CODERRE et al., 2004). Tal modelo consiste em indução de isquemia prolongada (3 horas) seguida de rápida reperfusão da pata traseira dos animais. O modelo foi originalmente descrito para ratos (CODERRE et al., 2004), tendo sido posteriormente padronizado para camundongos (MILLECAMPS et al., 2010). A pata submetida à isquemia exibe hiperemia e extravasamento de plasma, de forma aguda, e sintomas semelhantes aos da dor neuropática, incluindo hiperalgesia a estímulo mecânico nocivo e alodinia mecânica sem, entretanto, apresentar sinais indicativos de lesão nervosa (CODERRE et al., 2004). Este modelo produz, desta forma, sintomas comparáveis aos que acometem os pacientes com SDCR-I, com uma resposta inflamatória inicial com hiperemia e edema precoce seguido de hiperalgesia e alodinia de longa duração (KOBAN et al., 2003; BRATTI, 2011).

Figura 9 – Modelo de isquemia-reperfusão da pata.



Fonte: Próprio autor (2012).

Fotografias representativas das patas traseiras de ratos no modelo de SDCR por isquemia-reperfusão da pata. Antes da aplicação do elástico-torniquete (A), durante o torniquete (B), 5 min após a reperfusão (C), e 24 h após a reperfusão (D).

Cabe ressaltar que neste modelo, da mesma forma que em pacientes com SDCR, o segmento corpóreo afetado apresenta diminuição da oxigenação pela hemoglobina capilar (HbO<sub>2</sub>) e um aumento de lactato periférico, refletindo aumento da glicólise anaeróbica (CODERRE et al., 2004). Tais fatores são consistentes com condições de isquemia com presença de estresse oxidativo resultando em microangiopatia no tecido muscular (CODERRE; BENNETT, 2010). Desta forma este modelo se presta perfeitamente ao estudo do efeito anti-inflamatório e da atividade antioxidante de terapias e fármacos com vistas a sua posterior aplicação clínica.

#### 1.3.3.1 Processo inflamatório no modelo da SDCR-I

Embora a etiologia precisa da SDCR-I seja desconhecida, uma atividade inflamatória persistente tem sido demonstrada em vários estudos (HUYGEN et al., 2002; HUYGEN et al., 2004; WESSELDIJK et al., 2008; MARINUS et al., 2011). Além do aumento na expressão e

liberação de diversos mediadores inflamatórios, vários aspectos clínicos da SDCR-I, como a formação de edema e mudanças na temperatura local e dor crônica, atestam em favor de sua natureza inflamatória (HUYGEN et al., 2002; BRATTI, 2011).

O envolvimento do sistema imune ativado pode implicar em subsequente liberação de neuropeptídeos, citocinas ou eicosanóides, os quais, por sua vez, levariam a uma interação complexa de mediadores inflamatórios primários e secundários estabelecendo um quadro de inflamação (HUYGEN et al., 2004).

Coderre e Bennett (2010) propõem que a causa fundamental da dor na SDCR-I seria uma isquemia persistente nos tecidos profundos (músculos, ossos, e nervos) e consequente reação inflamatória e aumento do estresse oxidativo produzindo alteração microvascular posterior à lesão.

Em pacientes com SDCR-I, a lesão tecidual profunda leva à formação de edema e ao desenvolvimento de uma síndrome do tipo compartimental, já que a pressão exercida pelo acúmulo intersticial de plasma extravasado dentro de um espaço anatomicamente limitado obstrui os capilares dos tecidos adjacentes. Estes eventos levam à lesão microvascular persistente (CODERRE; BENNETT, 2010).

Nos tecidos isquêmicos ocorre o acúmulo de enzimas oxidativas no local lesionado, em especial da xantina oxidase e da NADPH oxidase. Após a reperfusão, as oxidases acumuladas reduzem o oxigênio e as células que compõem os microvasos são expostas a altos níveis de radicais livres de oxigênio que danificam as células vasculares endoteliais e musculares lisas (MCCORD, 1987). Além disso, as células endoteliais das arteríolas liberam menos óxido nítrico, que por sua vez é convertido em radicais livres de nitrogênio após a interação com radicais livres de oxigênio. As células danificadas durante este processo passam a liberar inúmeros mediadores pró-inflamatórios que aumentam a expressão de moléculas quimiotáticas, promovendo o recrutamento de monócitos, leucócitos e plaquetas as quais aumentam ainda mais a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  (WESSELDIJK et al., 2008).

Estes eventos conduzem ao vasoespasmos arterial e fluxo lento/não-refluxo na microvasculatura de tecidos profundos, o que produz isquemia persistente levando à inflamação crônica. Nos músculos e ossos, a isquemia e a inflamação resultantes (incluindo a produção de lactato) ativam e sensibilizam nociceptores. No tecido nervoso periférico, a isquemia e a inflamação induzem descargas ectópicas e levam ao desenvolvimento de hiperalgesia e alodinia

(CODERRE; BENNETT, 2010).

Em favor desta teoria, diversos estudos clínicos demonstraram que pacientes com SDCR exibem aumentos significativos de citocinas pró-inflamatórias, incluindo da IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , além de uma diminuição na taxa de citocinas anti-inflamatórias, incluindo a IL-10, no plasma circulante e no fluido cerebrospinal (UCEYLER et al., 2007; KRAMER et al., 2011). Além disso, em ratos submetidos ao modelo de IR da pata os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) se encontram elevados no músculo da pata (CODERRE et al., 2004).

Durante a inflamação crônica, as células imunes ativadas geram espécies reativas de oxigênio (EROs), que subsequentemente produzem dano oxidativo juntamente com um desequilíbrio concomitante no estado redox. A geração de EROs é portanto, um fator importante na manutenção da inflamação, e a ativação de células inflamatórias que pode, por sua vez, gerar EROs, conduzindo a um ciclo vicioso de produção excessiva de estresse oxidativo/quadro inflamatório (TAHA; BLAISE, 2012).

### 1.3.3.2 Estresse oxidativo no modelo da SDCR-I

O estresse oxidativo está envolvido em um grande número de doenças, incluindo doenças cardiovasculares, respiratórias, doenças neurodegenerativas e gastrointestinais, sendo ainda associado ao envelhecimento e à dor (YOUNG; WOODSIDE, 2001; KIM; SHIN; LEE, 2012).

As mitocôndrias convertem a energia armazenada em nutrientes em ATP/ADP que impulsiona o trabalho dentro do corpo e fornece a principal fonte de ATP para a maioria das células, entretanto, ao mesmo tempo, a cadeia respiratória mitocondrial é uma importante fonte de EROs dentro da célula (JAMES et al., 2012).

As EROs são moléculas quimicamente reativas contendo o elemento oxigênio com um ou mais elétrons desemparelhados. As EROs são formadas como um subproduto natural do metabolismo normal do oxigênio e têm um papel importante na sinalização celular e na homeostase (KOHEN; NYSKA, 2002). No entanto, níveis elevados de EROs são citotóxicos e podem resultar em danos que incluem a morte celular, mutações, aberrações cromossômicas e carcinogênese (CERUTTI, 1989).

A concentração de EROs intracelular depende da produção e/ou remoção do sistema antioxidante. Em geral, as células contêm um

grande número de antioxidantes para prevenir ou reparar os danos causados pelas EROs, assim como para regular as vias de sinalização redox-sensíveis. Algumas das enzimas antioxidantes primárias contidas em células de mamíferos são a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a peroxidase e a glutatona peroxidase (GPx). Além de defesas enzimáticas as células possuem defesas não-enzimáticas tais como as vitaminas C e E, carotenóides, flavonóides, pigmentos biliares, urato e os tióis (JAMES et al., 2012). O mecanismo de ação dos antioxidantes é bem variado, desde a remoção do oxigênio do meio, a varredura das EROs, o sequestro dos metais catalizadores da formação de EROs, o aumento da geração de antioxidantes endógenos ou mesmo a interação de mais de um destes mecanismos (WEYDERT; CULLEN, 2010).

Uma vez que a mitocôndria é a principal fonte de EROs (TURRENS, 2003), é razoável supor que a disfunção mitocondrial relacionada com o estresse oxidativo possa desempenhar um papel importante na patogênese da SDCR. Durante a isquemia, a mitocôndria tem parte da funcionalidade afetada e ocorre redução sequencial do oxigênio que leva a produtos intermediários. Os produtos intermediários do oxigênio, por sua vez, não são completamente reduzidos e, portanto, são bastante reativos (EROs). A concentração destas EROs é limitada em tecidos não isquêmicos graças ao balanço feito pelas defesas antioxidantes (FERRARI et al., 1991).

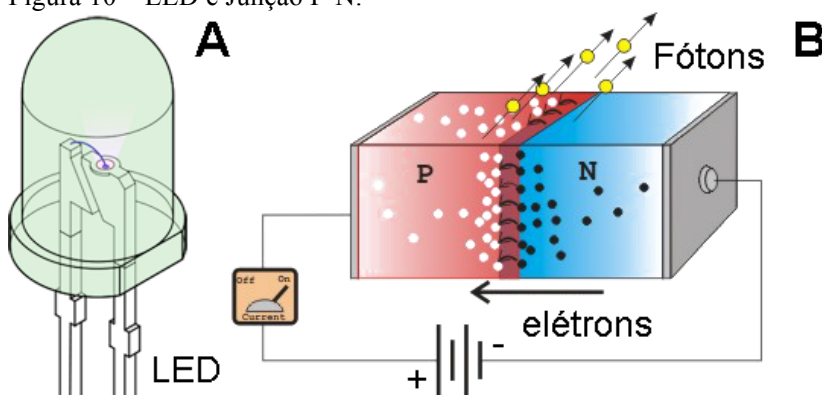
Tan e colaboradores (2011) observaram que as mitocôndrias obtidas do tecido muscular de pacientes com SDCR-I apresentavam reduzida produção de ATP mitocondrial e da taxa de oxidação de substratos em comparação com o tecido muscular de pacientes controle, o que sugere que a produção de energia mitocondrial reduzida combinada com aumento de EROs possa contribuir para a lesão do tecido muscular de pacientes com SDCR-I (TAN et al., 2011). Além disso, Eisenberg e colaboradores (2008) demonstraram aumentos significativos nos níveis de malondialdeído, desidrogenase láctica e antioxidantes (peroxidase, superóxido dismutase, ácido úrico), no soro e saliva de pacientes com SDCR-I em comparação com pacientes saudáveis (EISENBERG et al., 2008). Coderre e colaboradores (2008) detectaram níveis elevados de malondialdeído nos músculos das patas traseiras de ratos e demonstraram que a hipersensibilidade ao estímulo mecânico poderia ser reduzida por sequestradores de radicais livres e agentes antioxidantes (CODERRE et al., 2004; CODERRE; BENNETT, 2008). Corroborando estes dados foi demonstrado em pacientes com SDCR-I que o tratamento com a vitamina C (agente antioxidante) reduz a prevalência da síndrome após fraturas do punho (ZOLLINGER et al.,

2007).

#### 1.4 TERAPIA POR DIODO EMISSOR DE LUZ

A terapia por diodo emissor de luz (LEDT, do inglês *Light-emitting diode therapy*) é uma forma de fototerapia que utiliza como fonte de irradiação os LEDs (VINCK, E. et al., 2005). LEDs são diodos semicondutores (junção P-N) que quando energizados emitem luz (SCHUBERT, 2006) (Fig. 10).

Figura 10 – LED e Junção P-N.



Fonte: Adaptado de Schubert (2006).

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

Os termos "Fototerapia" e "Terapia Fotônica de baixa intensidade" dizem respeito às intervenções terapêuticas não invasivas com luz, como por exemplo, a irradiação do tecido cutâneo e subcutâneo para a reparação tecidual e a irradiação transcutânea para alívio da dor, sejam estas realizadas com diodos de LED ou LASER (do inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*; Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação) de baixa potência (ENWEMEKA, 2005). Esta última também pode ser denominada de LLLT (do inglês *Low Level Laser Therapy*).

O emprego terapêutico da luz data da antiguidade, com primeiros

relatos de origem egípcia (aproximadamente 1400 aC), nos quais são descritos tratamentos, em especial os de afecções cutâneas pela exposição à luz solar.

Em 1901, o dermatologista e pesquisador dinamarquês Nils Finsen, publicou seus resultados do tratamento de *Lupus vulgaris* com doses concentradas de radiação UV, uma forma de terapia fotônica, trabalho este que lhe rendeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1903 (ROELANDTS, 2002). Atualmente, a fototerapia com UV-B tem sido utilizada para o tratamento da acne vulgar, por exemplo (ZEICHNER, 2011).

Já na década de 1960, Endre Mester conduziu uma série de experiências sobre o potencial cancerígeno do LASER de baixa potência em camundongos. Seus resultados demonstraram que esta modalidade de fototerapia além de não induzir câncer, estimulou o crescimento do pêlo dos animais (MESTER; SZENDE; GARTNER, 1968). Tal demonstração pode ser considerada a primeira sobre o efeito bioestimulador da fototerapia com LASER de baixa intensidade. Tal fato estimulou este cientista húngaro a realizar outros estudos que culminaram na confirmação da eficácia da luz vermelha na cicatrização de feridas (BAROLET, 2008).

A partir destas pesquisas iniciais a LLLT passou a ser intensamente pesquisada, e hoje é amplamente utilizada, especialmente em dermatologia e fisioterapia, com inúmeras aplicações terapêuticas (MELIS; DI GIOSIA; ZAWAWI, 2012).

Durante as últimas décadas, a LEDT, uma forma de fototerapia não-invasiva e de baixo custo, tem sido empregada clinicamente como uma alternativa à terapia com laser de baixa intensidade (CASALECHI et al., 2009), tendo sido inicialmente desenvolvida pela NASA (do inglês National Aeronautics and Space Administration) com o intuito de estimular o crescimento de plantas em estações espaciais e, mais tarde, para acelerar a cicatrização de tecidos e reduzir a dor (WHELAN et al., 2001; WHELAN et al., 2002; 2003; HODGSON et al., 2012). Tais investigações despertaram o interesse da utilização da LEDT em uma variedade de condições que vão desde fins cosméticos, cicatrização de tecidos e tratamento de lesões de tecidos moles (VINCK, E. M. et al., 2005) até o tratamento do câncer de pele (BAROLET, 2008) e mais recentemente o tratamento da dor e condições inflamatórias (ABRAMOVITS; ARRAZOLA; GUPTA, 2005).

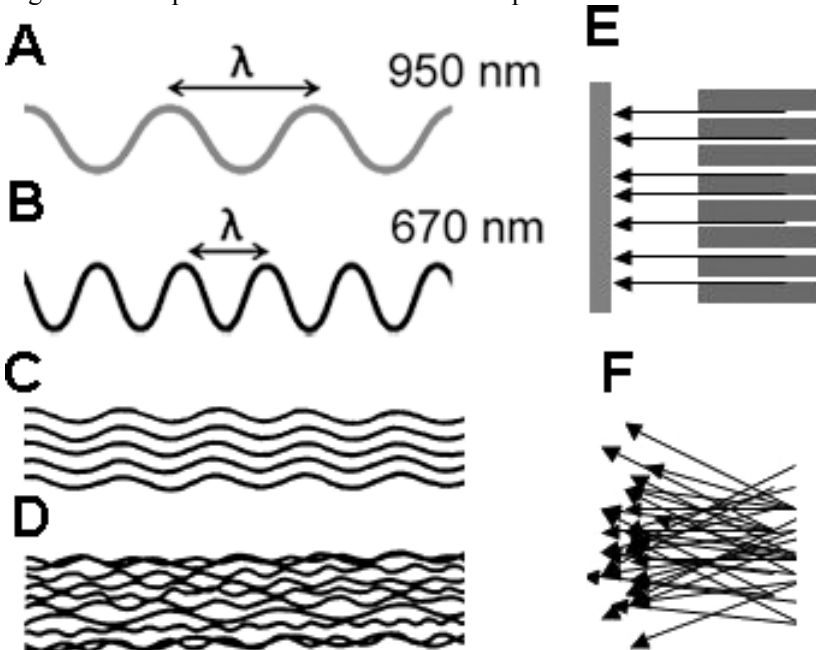
Primeiramente os efeitos biológicos da fototerapia foram explicados pela propriedade de coerência (ver Fig. 11) da luz emitida por LASERS (MESTER; MESTER; MESTER, 1985). Entretanto, novos



estudos indicaram que a coerência não desempenha um papel essencial na interação luz-tecido, em primeiro lugar, foi demonstrado que tanto a luz coerente como a não-coerente apresentam a mesma eficácia (LOBKO; KARU; LETOKHOV, 1985; PONTINEN; AALTOKALLIO; KOLARI, 1996) e que, além disso, a coerência é perdida assim que atravessa as primeiras camadas da pele (LOBKO; KARU; LETOKHOV, 1985; BASFORD, 1995; NUSSBAUM, 2003). Assim, pode-se dizer que estas pesquisas impulsionaram a expansão da fototerapia com fontes emissoras de luz não coerentes como os diodos emissores de luz - LEDs.

Os diodos de LASER e LEDs diferem em alguns pontos importantes além da característica da coerência da emissão da luz (Fig. 11). Lasers são monocromáticos (comprimento de onda de cor única), colimados (não-divergente) e coerentes (comprimentos de onda em fase), em contraste, LEDs emitem luz quase monocromática, não colimada e não-coerente, em uma banda espectral muito estreita, entre 5 e 30 nm de largura, com picos de emissão que se ajustam precisamente aos picos de absorção dos cromóforos endógenos quando o comprimento de onda e a dose são corretamente selecionados (COSTA; CORRAL-BAQUES; AMAT, 2007).

Figura 11 – Aspectos físicos da luz irradiada por LASERs e LEDs.



Fonte: Adaptado de Baxter (2003).

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

Estudos indicam a existência de uma “janela de atuação terapêutica”, entre cerca de 600 nm e 1200 nm (NIEMZ, 2007; BAROLET, 2008). Tal evidência se deve ao fato que a estimulação fotônica em comprimentos de onda localizados neste espectro, no caso, nas radiações vermelha e infravermelha, penetram nos tecidos biológicos com menor perda, atingindo estruturas mais profundas (Fig. 12).

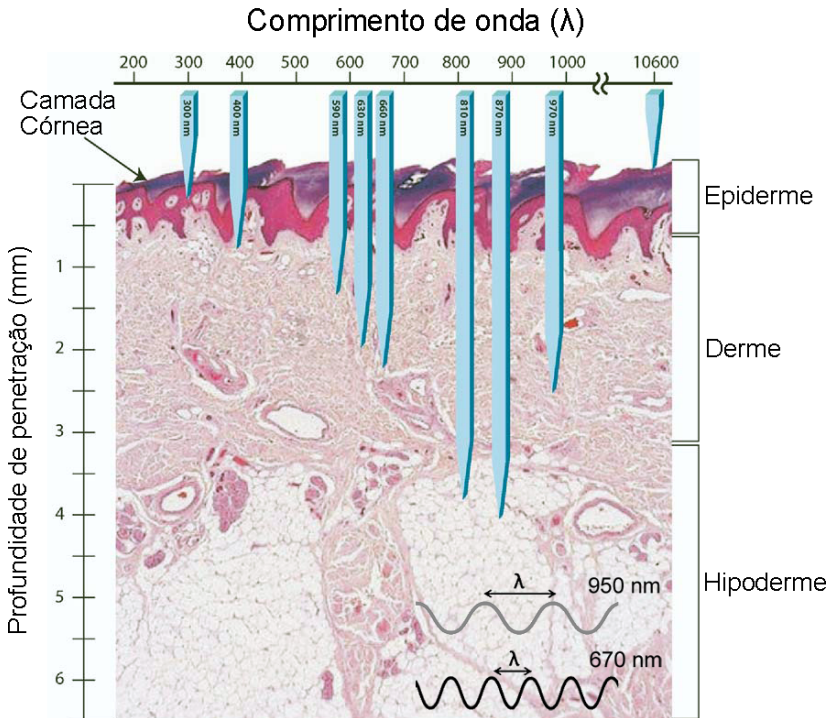
A LEDT com comprimento de onda no espectro do vermelho e infravermelho (600-1200 nm) pode modular a proliferação de fibroblastos, a síntese de colágeno, promover angiogênese, estimular macrófagos e linfócitos por melhorar o metabolismo energético no interior da mitocôndria, além de promover a produção de fatores de crescimento (EELLS et al., 2004; DESMET et al., 2006). Além disso, sugere-se que a LEDT nesta faixa espectral (600-1200 nm) altera a expressão de genes envolvidos na cicatrização de tecidos e modulação da transmissão dolorosa (EELLS et al., 2004).

Mais especificamente, o efeito analgésico da LEDT nesta faixa espectral foi demonstrado em estudos com pacientes portadores de dor crônica severa de etiologias diversas (COSTA et al., 2008), em dor muscular em humanos induzida experimentalmente (VINCK et al., 2006), em casos de neuropatia periférica diabética (SWISLOCKI et al., 2010) e no tratamento da hipersensibilidade dentária (LIZARELLI et al., 2010), mucosite oral e dor bucal (WHELAN et al., 2002; RIMULO et al., 2011; HODGSON et al., 2012). Em estudos com animais, a LEDT reduziu a mucosite induzida pela quimioterapia em hamsters (SACONO et al., 2008).

Adicionalmente, foi demonstrado que a LEDT apresenta atividades anti-inflamatórias no tratamento clínico de lesões inflamatórias produzidas pela acne (GOLDBERG; RUSSELL, 2006; TREMBLAY et al., 2006; LEE; YOU; PARK, 2007; FIORIO et al., 2011; WHEELAND; DHAWAN, 2011; KWON et al., 2012), sendo amplamente utilizada em dermatologia para tal fim.

Além disso, o tratamento com a LEDT foi eficaz em modelos experimentais de periodontite (CHANG et al., 2012; FONSECA et al., 2013), na lesão muscular induzida por exercício intenso (CAMARGO et al., 2012), na lesão do tendão de Aquiles (XAVIER et al., 2010), no modelo de transecção do ligamento cruzado anterior (OSHIMA et al., 2011) e na lesão do nervo isquiático (SERAFIM et al., 2012), bem como em modelos de inflamação in vitro (LIM et al., 2007; YAMAURA et al., 2009; CHOI et al., 2012; KWON et al., 2012).

Figura 12 – Profundidade de penetração x comprimento de onda ( $\lambda$ ).



Fonte: Adaptado de Barolet (2008).

Estudos indicam que a radiação vermelha e infravermelha penetra os tecidos biológicos com menor perda, atingindo estruturas mais profundas, fato que delimita uma importante “janela terapêutica”, entre cerca de 600 nm e 1000 nm.

De uma forma geral, embora todos os tipos de fototerapia sejam regularmente utilizados na prática clínica, existem poucos estudos que demonstram seu efeito analgésico. Além dos estudos supracitados realizados com a LEDT, pode-se citar que a LLLT, por exemplo, produziu analgesia significativa em modelos experimentais de dor neuropática em ratos, incluindo o modelo de lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI, do inglês chronic constriction injury) (GIULIANI et al., 2004; BERTOLINI et al., 2011; HSIEH et al., 2012), e o de secção completa do nervo isquiático (LORENZINI et al., 2010). Além disso, a laserterapia se mostrou eficaz no tratamento da parestesia e dormência decorrentes da síndrome do túnel do carpo, e melhorou a

força de preensão manual e os parâmetros eletrofisiológicos em um estudo clínico (SHOOSHTARI et al., 2008).

A terapia por luz polarizada, outra modalidade de fototerapia, por outro lado, induziu analgesia em modelos de nocicepção aguda em camundongos, tais como a estimulação elétrica da pata e o teste de formalina (TAMAROVA; LYMANYSKYI; HULIAR, 2005; LIMANSKY; TAMAROVA; GULYAR, 2006; TAMAROVA; LIMANSKY; GULYAR, 2009), e, em um estudo clínico randomizado e controlado, foi considerada uma modalidade eficaz e segura para o tratamento de diversas dores crônicas em conjunto com bloqueio nervoso ou local (HUANG et al., 2012).

### **1.4.1 Mecanismos de Ação da Fototerapia**

Apesar das inúmeras pesquisas, os exatos mecanismos de ação da fototerapia ainda não estão completamente elucidados (BAROLET, 2008).

Ao ser irradiado sobre a pele, o feixe luminoso sofre dois processos: reflexão, com uma parcela sendo refletida, e penetração, com parte penetrando o tecido em proporções dependentes do comprimento de onda, da natureza da superfície tecidual e do ângulo e incidência (LOW, 2001; BAXTER, 2003). A parcela da radiação luminosa que não é refletida, por sua vez pode sofrer absorção ou espalhamento; este último se refere a qualquer mudança na direção da propagação do feixe luminoso e, novamente, depende do comprimento de onda do feixe incidente e das características do tecido receptor (TIPLER, 2000).

A parcela restante da radiação luminosa é absorvida por moléculas fotoceptoras ou fotorreceptoras, capazes de serem excitadas pelos fótons incidentes em decorrência de suas configurações eletrônicas ou atômicas. Dentre as moléculas capazes de reagir com os fótons estão os aminoácidos, os ácidos nucleicos e os cromóforos. Os aminoácidos e ácidos nucleicos apresentam absorção significativa no espectro ultravioleta (BAXTER, 1995), os cromóforos, por sua vez, absorvem luz no espectro visível, sendo a hemoglobina e a melanina os mais comuns (BAXTER, 2003; NUSSBAUM, 2003), além de alguns componentes da cadeia respiratória, sobretudo a citocromo c-oxidase, que absorve tanto a radiação no espectro visível quanto no infravermelho (KARU, 1999).

A hipótese mais aceita é a de que a interação entre a molécula fotoceptora e o feixe luminoso resulta na aceleração da transferência de elétrons na cadeia respiratória da mitocôndria por meio de uma mudança nas propriedades de oxirredução dos transportadores (KARU, 2002).

Neste processo, uma fração da energia de excitação é convertida em calor com incremento na temperatura local dos cromóforos, e tal incremento, por sua vez, pode causar alterações estruturais nos fotoceptores e, deste modo, desencadear alterações bioquímicas (LETOKHOV, 1991). Além da mitocôndria, certas moléculas fotoceptoras, como as porfirinas e flavoproteínas, também podem ser reversivelmente convertidas em estruturas fotossensibilizadas, com a geração de oxigênio molecular ( $O_2$ ), o qual pode exercer papel mediador nos efeitos biológicos da irradiação. Finalmente, ocorre a liberação de radicais livres, como o superóxido ( $O_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), frente à redução do oxigênio em água no final da cadeia respiratória. Embora a mitocôndria apresente um mecanismo de reabsorção de tais radicais, essas substâncias podem desencadear respostas secundárias múltiplas, uma vez que constituem fonte de elétrons para a fosforilação do ADP (KARU, 1989; 1999).

Estes principais mecanismos que ocorrem durante a exposição à luz são seguidos por reações escuras (mecanismos secundários) que ocorrem quando a radiação efetiva é desligada. Assim, se inicia uma complexa cascata de sinalização celular ou transdução e amplificação do sinal fotônico, associada, por exemplo, a mudanças na homeostase celular, alterações nos níveis de ATP ou AMPc, modulação da síntese de DNA e RNA, alterações da permeabilidade da membrana, alcalinização do citoplasma e despolarização da membrana da célula (GRECO et al., 1989; VACCA et al., 1993; 1994; KOLAROVA; DITRICOVA; WAGNER, 1999; REDDY, 2004). Esta sequência de eventos, finalmente, resulta em uma série de efeitos fisiológicos essenciais para a promoção do processo de cicatrização de tecidos, para analgesia ou outras respostas favoráveis, dentre as quais, a aceleração de processos inflamatórios, a reabsorção de edemas, a regeneração de vasos linfáticos ou a regeneração nervosa (GRECO et al., 1989; VACCA et al., 1993; 1994; BAXTER, 1995; SKINNER et al., 1996).

Os mecanismos possíveis para a analgesia induzida pela LEDT são ainda menos compreendidos, uma vez que, provavelmente, nem todos os mecanismos de ação são identificados atualmente. No entanto, está bem estabelecido que a terapia fotônica influencia a síntese, liberação e metabolismo de inúmeras substâncias sinalizadoras envolvidas na analgesia, tais como as endorfinas, o óxido nítrico, as prostaglandinas, a bradicinina, a acetilcolina e a serotonina. Além desses efeitos fotobiológicos existem evidências experimentais da diminuição do processo inflamatório, tais como da diminuição da atividade das fibras C, do aumento da circulação sanguínea e da redução da

excitabilidade do sistema nervoso (VACCA et al., 1994; REDDY, 2004; VINCK et al., 2006).

#### 1.4.1.1 Papel do óxido nítrico na fototerapia

O óxido nítrico (NO) é formado a partir de L-arginina pela ação de formas neuronais e não neuronais da sintase de NO [nNOS (neuronal); eNOS (endotelial) ou iNOS (induzível)] (ESPLUGUES, 2002). O NO e as suas enzimas associadas estão envolvidas em muitos processos fisiológicos e patofisiológicos (OLSON; VAN DER VLIET, 2011). Em vertebrados superiores, o NO tem um papel fundamental na manutenção da homeostase da musculatura lisa (especialmente no músculo liso vascular) e dos neurônios do trato gastrointestinal. Além disso, o NO está intimamente envolvido na regulação da digestão, vigília, função sexual, percepção da dor e prazer, recuperação da memória e do sono (HIRST; ROBSON, 2011). Já o envolvimento do NO na modulação da nocicepção é complexo. Vários estudos demonstram que o NO pode promover efeitos tanto pró quanto antinociceptivos dependendo do tipo e da fase do processo nociceptivo e também do tipo de estímulo utilizado (de origem mecânica ou térmica). Além disso, doadores ou inibidores de NO, dependendo da dose, podem causar ou nocicepção ou antinocicepção (CURY et al., 2011).

Adicionalmente, tem-se observado que dependendo do local de ativação, a via L-arginina/NO/cGMP poderia induzir efeitos opostos, isto é, nocicepção, ou antinocicepção. Em ratos, a administração intraplantar de fármacos capazes de ativar esta via, por exemplo, induz fenômenos nociceptivos, ao passo que a injeção subcutânea resulta em antinocicepção. Estes achados sugerem a existência de diferentes subconjuntos de neurônios sensoriais nociceptivos primários por meio dos quais o NO desempenha papéis opostos (VIVANCOS; PARADA; FERREIRA, 2003).

Não obstante a sua função dual, em geral se observa que tanto o excesso quanto a deficiência de NO parecem estar implicados em quadros de dor e inflamação (MICLESCU; GORDH, 2009), entretanto, na periferia, em diferentes abordagens experimentais, esta molécula é um mediador-chave de fenômenos nociceptivos (SCHMIDTKO; TEGEDER; GEISLINGER, 2009). Neste sentido, foi demonstrado (CHEN et al., 2010) recentemente que o pré-tratamento com L-NG-Nitroarginina Metil Ester (L-NAME, um inibidor não seletivo de NOS) atenua significativamente a hiperalgesia térmica no modelo de inflamação da pata induzida por CFA em camundongos (CHEN et al.,

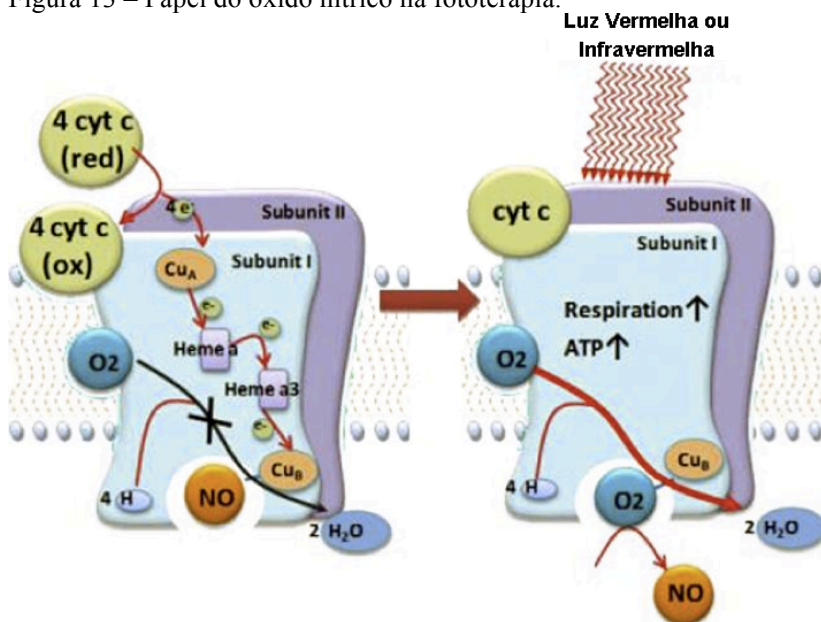
2010).

Durante a última década foi descoberto que as células frequentemente utilizam o NO para modular a respiração celular alterando a dinâmica mitocondrial (LUO; CIZKOVA, 2000) (Fig. 13). Um dos efeitos da redução da respiração em alguns locais seria de desviar oxigênio para outras células e tecidos, evitando uma redução excessiva dos níveis de oxigênio. Desta forma, a respiração celular não apenas gera energia, mas também um mecanismo de feedback que permite à célula monitorar e responder ao seu meio ambiente (BAROLET, 2008; HASHMI et al., 2010).

Evidências sugerem que a fotobiomodulação envolve a estimulação do metabolismo da energia celular e produção de energia mediada por ação das mitocôndrias como o fotorreceptor celular primário ou alvo para a absorção dos fótons. Na mitocôndria, o complexo IV da cadeia respiratória (citocromo c oxidase) se constitui no principal cromóforo que absorve a luz incidente, embora outros citocromos, porfirinas, e proteínas heme possam estar envolvidos. Desta forma, a absorção de luz leva ao aumento da atividade do citocromo c oxidase (HU et al., 2007), deslocando o NO (KARU; PYATIBRAT; AFANASYEVA, 2005) e aumentando a síntese de ATP (PASSARELLA et al., 1984; PASTORE et al., 1996). Assim, as alterações em moléculas sinalizadoras intracelulares, tais como íons cálcio, EROs e fatores de transcrição redox sensíveis como o NF- $\kappa$ B também estão envolvidos nos efeitos da luz (SHARMA et al., 2011).



Figura 13 – Papel do óxido nítrico na fototerapia.



Fonte: Hashmi, Huang et al. (2010).

O NO pode se ligar ao cobre (ou heme) em centros no citocromo c oxidase e inibir a respiração celular. O NO pode ser fotodissociado por absorção de luz no comprimento de onda do vermelho ou infravermelho, permitindo que o oxigênio retorne aumentando acentuadamente a respiração e formação de trifosfato de adenosina (ATP).

#### 1.4.2 Parâmetros Utilizados na Fototerapia

Em fototerapia o conhecimento dos vários parâmetros envolvidos na dosimetria é essencial para determinar a quantidade correta de energia necessária para o tratamento. Segue breve descrição destes parâmetros (ENWEMEKA, 2009).

- Comprimento de onda ( $\lambda$ ): A distância entre dois picos de onda é definida como um comprimento de onda. Quanto menor o comprimento de onda, maior a frequência de vibração da partícula de luz. Como regra geral, quanto maior o comprimento de onda de um dispositivo de fototerapia, maior a profundidade de penetração de seu feixe nos tecidos (MEINHARDT et al., 2008; ENWEMEKA, 2009). Note que na

Fig. 12, o infravermelho (950 nm) tem um maior comprimento de onda que a luz vermelha (670 nm), o que implica em maior grau de penetração. Por esta razão comprimentos de onda mais longos, em geral infravermelhos, são geralmente recomendados para o tratamento de lesões mais profundas.

- Potência radiante phi ( $\Phi$ ): É definida como a taxa na qual a energia é gasta. Geralmente é medida em watts (W), mas em fototerapia, uma vez que a quantidade de energia necessária para se obter benefícios terapêuticos é relativamente baixa, muitas vezes a potência radiante é medida em miliwatts (mW). Potência pode ser determinada matematicamente pelo cálculo de energia por unidade de tempo, ou seja, dividindo a energia medida em joules (J) pelo tempo medido em segundos (s): Potência (W) = Energia (J) / Tempo (s).
- Energia radiante (Q): Medida da energia da radiação eletromagnética e é expressa em joules (J). A energia radiante é calculada multiplicando-se a potência radiante pelo tempo, como mostra a seguinte relação matemática: Energia (J) = Potência (W) x Tempo (s).
- Área do feixe luminoso (a): Define a área coberta pelo feixe quer na ponta do aplicador quer em qualquer distância dada além desse ponto. Na ponta do aplicador, a área do feixe luminoso é essencialmente o mesmo que a área efetiva de radiação, portanto, pode ser facilmente assumido que ambos são intercambiáveis, quando o aplicador é colocado em contato direto com a pele do paciente.
- Densidade de potência ou irradiância (Ee): Pode ser definida como a razão da potência sobre a área da superfície irradiada. A irradiância é basicamente a energia emitida pelo feixe de luz por unidade de área. A densidade de potência é medida em watts por centímetro quadrado ( $W/cm^2$ ) e é calculada: Densidade de potência ( $W/cm^2$ ) = Potência (W) / Área ( $cm^2$ ).
- Densidade de energia ou fluência (H): Definida como a quantidade de energia fornecida por unidade de área sendo geralmente expressa como a dose na prática. Em outras palavras, é a energia dividida pela área, medida em joules por centímetro quadrado e representada por H. Como energia (J) = (W) x tempo (segundo) e densidade de energia = energia / área (a), segue-se que: Densidade de energia (H) = Potência ( $\Phi$ ) x tempo (t) / Área (a).

## 2 JUSTIFICATIVA

A dor afeta pelo menos 30% dos indivíduos durante algum momento da sua vida e, em torno de 10 a 40% destes episódios têm duração superior a um dia (SBED, 2013). Dados estatísticos indicam que a dor crônica é uma epidemia mundial que acomete em torno de 1,5 bilhão de pessoas em todo o mundo, sendo ainda mais alarmante, o fato de que cerca de 50 a 60% dos acometidos ficam parcial ou totalmente incapacitados, de maneira transitória ou permanente, comprometendo de modo significativo a qualidade de vida (INSTITUTE OF MEDICINE COMMITTEE ON ADVANCING PAIN RESEARCH AND EDUCATION, 2011). Não existem dados estatísticos oficiais sobre a dor no Brasil, mas a sua ocorrência tem aumentado substancialmente nos últimos anos (SBED, 2013).

Apesar dos esforços de pesquisadores em todo o mundo no entendimento dos mecanismos relacionados à indução e manutenção da dor bem como na descoberta de novas terapias, atualmente ainda não dispomos de medicamentos ou outros tratamentos que possam efetivamente aliviar a dor crônica com a velocidade ou a eficiência necessária para a maioria dos pacientes, sem que, no entanto, causem efeitos colaterais significativos que comprometam sua utilização (BORSOOK, 2012). Neste contexto justifica-se o estudo de terapias integrativas que possam complementar de forma segura e eficaz o tratamento da dor.

Estudos recentes demonstraram que a LEDT apresenta atividade analgésica em pacientes com dor crônica severa de etiologias diversas (COSTA et al., 2008), em modelo de dor muscular induzida experimentalmente em humanos (VINCK et al., 2006), no tratamento de neuropatia periférica diabética (SWISLOCKI et al., 2010), da hipersensibilidade dentária (LIZARELLI et al., 2010), mucosite oral e dor bucal (WHELAN et al., 2002; RIMULO et al., 2011; HODGSON et al., 2012), entretanto, há uma carência de estudos pré-clínicos que fornecem o aporte científico para a atividade analgésica da LEDT na dor de diferentes etiologias, e em especial, que enfoquem os possíveis mecanismos fotobiológicos da LEDT.

É importante ressaltar que a LEDT vem sendo amplamente empregada no tratamento da dor em milhares de pessoas em todo o mundo (BAROLET, 2008; YING et al., 2008). O incremento na utilização dessa terapia deve, entretanto, ser fundamentado em estudos sobre sua eficácia e segurança. Infelizmente, esta necessidade lógica e racional tem sido pouco observada. De fato, em fototerapia há um vasto

esquema de indicações sem fundamentação científica, além de estudos com resultados conflitantes, em especial devido a relatos imprecisos dos parâmetros terapêuticos e da dosimetria empregada (ENWEMEKA, 2009). Desta forma, justifica-se a importância de investigações científicas adequadas sobre os possíveis efeitos fisiológicos específicos que justifiquem ou não a utilização desta técnica terapêutica na clínica. Devidamente fundamentada, a LEDT pode ser uma importante ferramenta complementar no tratamento de quadros álgicos, em especial por ser uma terapia segura, não invasiva, com poucos efeitos adversos e de baixo custo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade analgésica da LEDT em modelos de nociceção aguda e crônica em camundongos, bem como investigar alguns dos possíveis mecanismos fotobiológicos envolvidos neste efeito.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Mensurar o efeito da LEDT na dor crônica neuropática induzida pelo esmagamento do nervo em camundongos:

- por meio de análises comportamentais (hipersensibilidade ao estímulo mecânico), funcionais (recuperação funcional do nervo isquiático) e histológicas (regeneração nervosa).

Determinar o efeito da LEDT na dor aguda de origem pós-operatória induzida pela incisão plantar em camundongos:

- por meio de análise comportamental (hipersensibilidade ao estímulo mecânico) e farmacológica (visando analisar o possível envolvimento via L-arginina-óxido nítrico, dos sistemas opioide, adenosinérgico e canabinoide no efeito analgésico da LEDT);

Quantificar o efeito da LEDT na Síndrome da Dor Complexa Regional do tipo I induzida pela isquemia-reperfusão da pata em camundongos:

- por meio de análises comportamentais (hipersensibilidade aos estímulos mecânico e térmico ao frio) e bioquímicas [dosar por meio de imunoenaios a expressão das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-1ra, bem como dos marcadores do estresse oxidativo (formação dos grupos carbonilados e de equivalentes do malondialdeído) e a atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase e catalase) no efeito analgésico da LEDT.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 ANIMAIS**

Os experimentos com animais foram realizados em camundongos Swiss machos de aproximadamente dois meses de idade, pesando entre 25 e 35 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob registro PP00577. Um total de 1016 camundongos foram utilizados na realização dos experimentos que fazem parte desta tese.

Uma vez recebidos do Biotério Central, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação, Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB/UFSC, em microisoladores com circulação de ar, em gaiolas de 12x30x18 cm (6 animais por gaiola), com temperatura mantida a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e ciclo 12 h claro/12h escuro (claro a partir das 6:00 h), com livre acesso a água e comida. Antes dos experimentos, os animais foram aclimatados ao laboratório por período mínimo de 1h, e todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas de cuidados com animais de laboratório e as diretrizes éticas para investigação de dor em animais conscientes (BRASIL, 2008; ZIMMERMANN, 1983). Por outro lado, é importante salientar que o número de animais utilizados e os estímulos empregados foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos dos tratamentos.

### **4.2 MODELO DE ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO**

#### **4.2.1 Protocolo de Indução do Modelo**

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados com os animais sob anestesia profunda induzida por uma solução de cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (20 mg/kg, i.p.). Após a verificação do estado de consciência do animal (por meio do pinçamento da cauda), foi efetuada tricotomia da área operada (coxa direita). Em seguida, foi feita uma incisão curvilínea na coxa direita do animal, iniciando acima e medialmente ao trocânter maior do fêmur e terminando próximo à fossa poplíteia, na inserção dos músculos isquiotibiais. A exposição do nervo isquiático foi obtida após a divulsão dos músculos semitendíneo e reto femoral. Com o auxílio de uma pinça hemostática não-serrilhada

(BAPTISTA et al., 2007), foi realizado o esmagamento do nervo isquiático direito por 30 segundos, apertando até o primeiro estágio da gramalheira da pinça, aproximadamente 10 mm acima da trifurcação do nervo (BRIDGE et al., 1994). Em seguida, um fio de sutura estéril não-absorvível (9-0) foi amarrado na bainha epineural para marcar o local do esmagamento, com o objetivo de auxiliar a análise histológica. Logo após, a divulsão muscular foi reparada com 3 pontos de sutura com fio absorvível (5-0) e realizada a assepsia no local com anti-séptico (Povidine®). Ao final do procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em sala aquecida até a completa recuperação da anestesia. Todos os grupos experimentais foram operados, com exceção dos animais do grupo sham, que foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico mas não sofreram o esmagamento do nervo isquiático.

#### **4.2.2 Grupos Experimentais e Tratamento com a LEDT**

O dispositivo de LED utilizado nos experimentos foi um MOLIMEDpen® (MDT Bioelectronics, Bettwiesen, Suíça), com 950 nm, irradiância de 80 mW/cm<sup>2</sup>.

Os grupos experimentais utilizados durante os experimentos no modelo de ENI (n = 8) foram: sham (submetidos ao procedimento cirúrgico mas não sofreram o esmagamento do nervo isquiático), ENI (submetidos ao ENI que não receberam tratamento com a LEDT), Off (submetidos ao ENI que receberam tratamento com a LEDT com o aparelho desligado) e LEDT (tratados com a LEDT: grupos 1 J/cm<sup>2</sup>, 2,5 J/cm<sup>2</sup> e 4 J/cm<sup>2</sup>).

Inicialmente, para a escolha da dosimetria da LEDT a ser utilizada, diferentes grupos de animais submetidos ao ENI foram tratados com diferentes densidades de energia ou fluências (1; 2,5 e 4 Joules) e avaliados em experimento do tipo decurso temporal.

Como resultado, a dose da LEDT escolhida para a realização dos experimentos subsequentes no modelo de dor neuropática induzida pelo ENI foi a densidade de energia mínima necessária para induzir efeito antinociceptivo significativo.

Além disso, para investigar se o estresse induzido pela contenção seria responsável por efeito analgésico da LEDT, um grupo de animais (n = 8) foi tratado com o dispositivo de LED desligado (os animais foram mantidos durante 32 segundos com sonda do equipamento LED ligeiramente em contato com o local da irradiação).

O tratamento foi realizado com os animais acordados, mantidos em tubo de plástico com os membros inferiores expostos durante do

tratamento. A irradiação foi realizada diretamente sobre o local do esmagamento do nervo, com o dispositivo em contato com a pele do animal.

#### **4.2.3 Avaliação da Hipersensibilidade Mecânica**

A hipersensibilidade ao estímulo mecânico (doravante denominada simplesmente de hipersensibilidade mecânica) foi avaliada de acordo com o método desenvolvido por Dixon (DIXON, 1980; CHAPLAN et al., 1994), modificado para camundongos (SOMMER; SCHAFERS, 1998) e denominado de *up-and-down*. Os animais foram aclimatados por uma hora, em compartimentos individuais de acrílico (9 cm x 7 cm x 11 cm) sobre uma plataforma de fundo gradeado. O estímulo mecânico foi direcionado perpendicularmente à superfície plantar dos animais. Foram analisadas as respostas (“retirada” ou não do contato da pata com o fundo gradeado) em relação à tensão aplicada por filamentos de von Frey (VFH; Stoelting, Chicago, EUA) calibrados para produzir forças (0,02; 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0 g) que produzem diferentes graus de estimulação mecânica (inócua ou nociva).

As sessões iniciaram com a aplicação do filamento 0,4 g. Quando o estímulo era nocivo - indicado pelo comportamento do animal de remover ou retirar, erguer a pata do contato com a grade - era utilizado filamento com menor valor em (g). Quando o estímulo era inócua - indicado pela permanência da pata em contato com a grade - era apresentado o filamento com maior valor subsequente em (g) a partir da última resposta, num total de no máximo seis testes não consecutivos. A sequência resultante de respostas positivas e negativas foi utilizada para interpolar a força correspondente a 50% do limiar de retirada da pata (em gramas, g). Os grupos foram avaliados antes do procedimento cirúrgico e nos dias pós-operatórios de 7, 10, 13, 16, 19 e 21, antes e 30 min após LEDT.

#### **4.2.4 Índices do Nervo Isquiático**

A avaliação da recuperação funcional do nervo isquiático foi realizada em uma pista de marcha confeccionada de MDF e vidro, com 50 cm de comprimento, 4,5 cm de largura e 10 cm de altura para as proteções laterais. O fundo da pista era feito de vidro, abaixo da pista há um espelho em um ângulo de 45° de inclinação (DIJKSTRA et al., 2000; BAPTISTA et al., 2007) (Fig. 14 A). Durante os 10 primeiros dias que antecederam a cirurgia, os animais receberam treinamento diário para se



familiarizarem com a pista de marcha.

A digitalização da marcha dos animais foi obtida por meio de uma câmera filmadora digital Panasonic PV-GS19 Mini DV posicionada a 1 m de distância da pista de marcha, acoplada a um microcomputador (IBM-PC compatível genérico). As capturas continham imagens da marcha dos animais em perfil, e por meio de um espelho colocado embaixo da pista num ângulo de 45° de inclinação, foi possível capturar imagens das pegadas dos animais. Por meio do programa “Pinnacle Studio” versão 8.0 as filmagens foram armazenadas (formato mpeg, 640 x 480 pixels/polegadas, taxa de amostragem 1096 Kbps e escrutinadas “off-line”, etapa em que foram isolados diversos “frames” utilizados para cálculo dos parâmetros dos índices no programa “Image-J” (versão 1.30, *National Institute of Health*; 2003). As imagens obtidas durante a marcha dos animais foram utilizadas para o cálculo do Índice Funcional do nervo Isquiático (IFC). Para calcular o Índice Estático do nervo Isquiático (IEC) imagens são obtidas com os animais em posição de repouso, sobre a pista de marcha, em espaço delimitado em 10 cm por barreiras que evitam que os animais caminhem livremente.

A partir das imagens coletadas os seguintes parâmetros foram obtidos: distância do calcanhar ao topo do terceiro dedo (PL), que depende da ativação do músculo gastrocnêmio e distância entre o primeiro e quinto dedo (TS) influenciada pelos músculos extensores e intrínsecos da pata (Fig. 14 B). Estes dados foram coletados do lado não operado (NPL e NTS) e do lado operado, pata experimental (EPL e ETS).

Para o cálculo do Índice Funcional do Nervo Isquiático (IFC - Fig. 14 C) foi utilizada a seguinte fórmula (INSERRA; BLOCH; TERRIS, 1998):

$$\text{IFC} = 118,9 \times \text{TSF} - 51,2 \times \text{PLF} - 7,5, \text{ onde,} \\ \text{TSF} = (\text{ETS} - \text{NTS}) / \text{NTS}; \text{PLF} = (\text{EPL} - \text{NPL}) / \text{NPL}$$

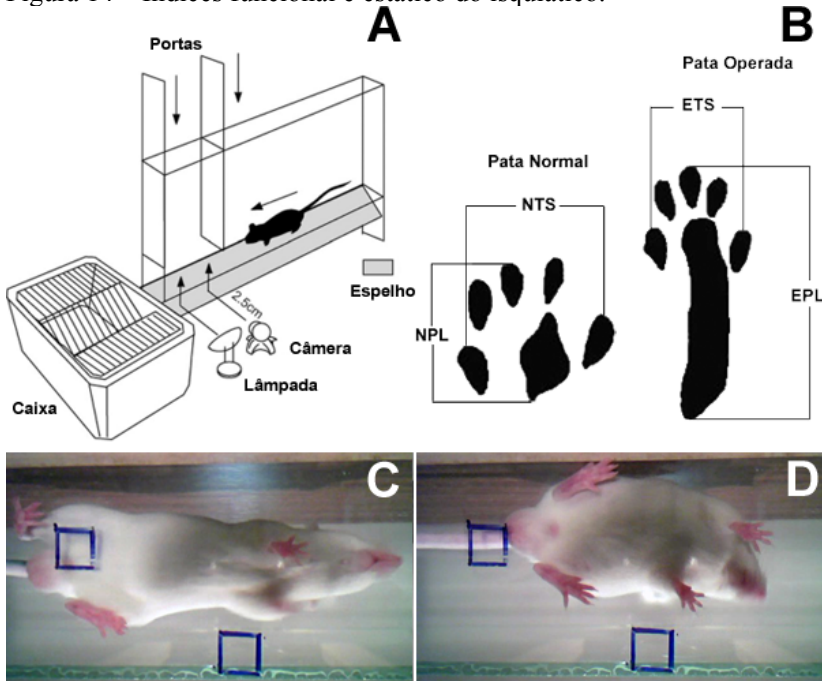
Para o cálculo do Índice Estático do Nervo Isquiático (IEC - Fig. 14 D) foi utilizada a seguinte fórmula (BAPTISTA et al., 2007):

$$\text{IEC} = 101,3 \times \text{TSF} - 54,03 \times \text{PLF} - 9,5, \text{ onde,} \\ \text{TSF} = (\text{ETS} - \text{NTS}) / \text{NTS}; \text{PLF} = (\text{EPL} - \text{NPL}) / \text{NPL}$$

Em ambos os índices, um valor de 0 corresponde à função normal (i.e., ambos os lados com o mesmo grau funcional) e um valor de -100 corresponde à completa perda de função de um lado. O teste foi

realizado antes do procedimento cirúrgico e nos dias pós-operatórios de 7, 10, 13, 16, 19 e 21 trinta minutos após a LEDT.

Figura 14 – Índices funcional e estático do isquiático.



Fonte: Adaptado de Baptista et al. (2007).

(A) Esquema da plataforma para avaliação dos índices do nervo isquiático; (B) Esquema representativo das medidas avaliadas nos índices; (C) Foto da marcha camundongo sobre a plataforma utilizada na avaliação do IFC; (D) Foto de camundongo em repouso sobre a plataforma utilizada na avaliação do IEC.

## 4.2.5 Histologia e análise morfométrica

### 4.2.5.1 Preparação das amostras

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

As amostras foram fixadas em uma solução de formalina zinco (cloreto de zinco 1,6%, formaldeído 4%, acetato de cálcio 20%) durante 24 horas. Após a fixação, as amostras foram colocadas em dicromato de potássio a 5% por 5 dias. Passado esse período, as amostras foram lavadas em água corrente e deixadas na água por toda noite para retirar todo o dicromato antes da desidratação gradual com etanol. Em seguida, foi seccionado segmento do nervo de 5 mm, 3 mm distalmente à lesão. Depois de uma cuidadosa desidratação em etanol, foi utilizada a metodologia de rotina (CARGNIN-FERREIRA; SARASQUETE, 2008), para a inclusão em parafina 58°C, utilizando como líquido intermediário o xilol e levando a cabo os seguintes passos: Desidratação e inclusão em parafina: Etanol 70% (mínimo 24 horas), Etanol 80% (45 minutos), Etanol 90% (45 minutos), Etanol absoluto 100 (45 minutos), Etanol absoluto II (45 minutos), Etanol-Xilol 1/1 (45 minutos), Xilol I (45 minutos), Xilol II (45 minutos), Parafina I (1 hora), Parafina II (1 hora), Parafina III (1 hora). O material incluído verticalmente em parafina e cortado em amostras de 5 µm em micrótomo Leica RM 2025 (Leica microsystems, Wetzlar, Alemanha). Os cortes foram então estirados e recolhidos em um banho termostático a 52°C e dispostos sobre lâminas.

#### 4.2.5.2 Técnicas histomorfológicas

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

#### 4.2.5.3 Tratamento das imagens

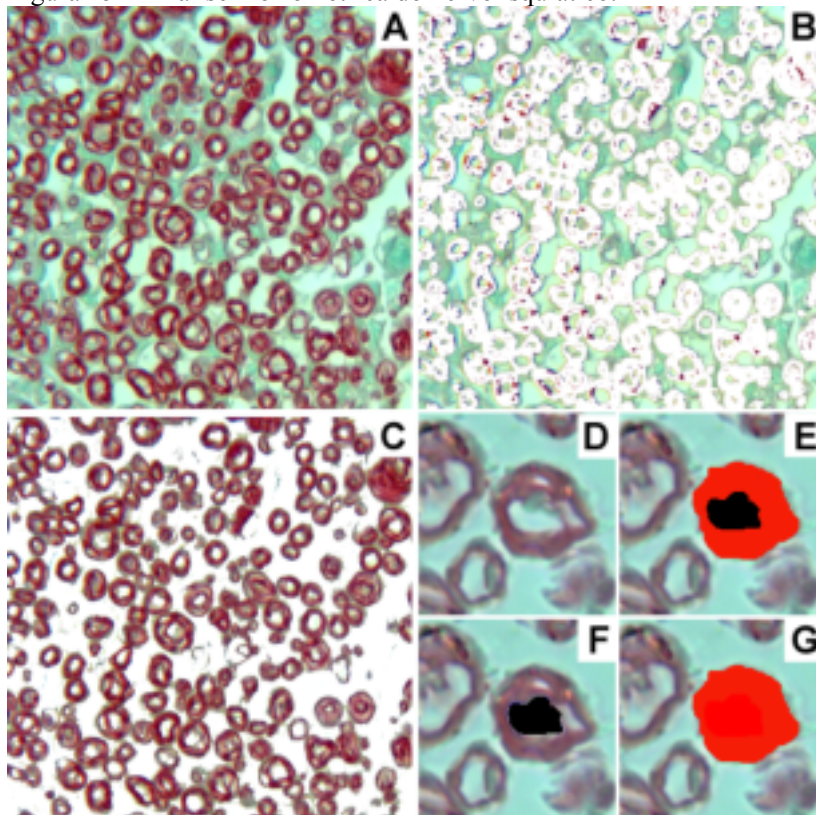
A análise histológica foi realizada em corte transversal da porção distal do nervo direito restrita ao tecido conjuntivo e à área de bainha mielinizada. As imagens foram adquiridas usando-se uma câmera digital de microscopia modelo TA - 0124-A, conectada a um microscópio de luz DME (Leica microsystems, Wetzlar, Alemanha). As imagens foram capturas em aumento de 400x e 1000x para análise no programa Image

Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, Maryland). Posteriormente, as imagens foram analisadas em um programa de imagem (Chptool) desenvolvido pelo Projeto Cyclops (Depto. De informática - UFSC) para análises histopatológicas para o Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário.

#### 4.2.5.4 Morfometria

Os critérios de seleção dos cortes foram a integridade da morfologia do nervo, particularmente do perineuro, qualidade da coloração, ausência de artefatos de técnicas (rachaduras, dobras). Depois de corados, os cortes foram observados e fotografados com microscopia de luz e uma série de 4 parâmetros foram quantificados: (1) densidade de fibras mielinizadas (fibras/área:  $150 \times 150$  pixels. Área delimitada a partir das imagens coletadas) e (2) área da bainha de mielina ( $\mu\text{m}$ ). Para este último parâmetro, foi escolhida uma área representativa, na qual foram contados 10 axônios íntegros. (3) Área de fibras mielinizadas (%) e (4) área de tecido conjuntivo (%). Os dados finais apresentados foram efetuados a partir da média dos valores obtidos em três imagens diferentes de cada animal avaliado (Fig. 15).

Figura 15 – Análise morfométrica do nervo isquiático.



Fonte: Próprio autor (2013).

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

### 4.3 MODELO DE INCISÃO PLANTAR

#### 4.3.1 Protocolo de Indução do Modelo

A incisão plantar foi realizada tal como descrito previamente por Pogatzki e Raja (2003). Os camundongos foram levemente anestesiados com 1-2% de isoflurano aplicado por meio de uma máscara nasal. Após a preparação estéril da pata traseira direita, uma incisão de 5 mm longitudinal foi feita por meio da pele e fáscia da parte plantar da pata com um bisturi de lâmina número 11. A incisão iniciou a 2 mm da extremidade proximal do calcâneo em direção aos dedos da pata. O músculo plantar foi elevado com um fórceps, mantendo a origem e inserção do músculo intacto. Após a incisão, a pele foi suturada com um fio de nylon 8.0 e a sutura coberta com solução povidine-iodo® (10%).

#### 4.3.2 Grupos Experimentais e Tratamento com a LEDT

Os grupos experimentais utilizados durante os experimentos com o modelo de IP ( $n = 8$ ) foram: sham (anestesiados porém não submetidos à IP), IP (submetidos à IP que não receberam tratamento com a LEDT), Off (submetidos à IP que receberam tratamento com a LEDT com o aparelho desligado) e LEDT (submetidos à IP e tratados com a LEDT nas densidades de energia de 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13 J/cm<sup>2</sup>).

Inicialmente, para a escolha da dosimetria da LEDT a ser utilizada, diferentes grupos de animais submetidos à IP foram tratados com diferentes densidades de energia ou fluências (1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13 Joules) e avaliados em experimento do tipo decurso temporal. A dose escolhida para a realização dos experimentos com este modelo foi a densidade de energia ou fluência da LEDT com melhor efeito analgésico na dor pós-operatória induzida pela IP, a saber 9 J/cm<sup>2</sup>.

Nos experimentos para investigação do mecanismo de ação da LEDT os seguintes grupos foram utilizados: salina ou veículo; salina ou veículo + antagonista do sistema; salina ou veículo + agonista do sistema; antagonista + agonista; salina ou veículo + LEDT e antagonista + LEDT. A fluência da LEDT utilizada nestes experimentos foi a de 9 J/cm<sup>2</sup>.

A irradiação foi aplicada diretamente sobre o local da incisão com o dispositivo em leve contato com o aspecto plantar da pata posterior direita dos animais.

### 4.3.3 Avaliação da Hipersensibilidade Mecânica

A hipersensibilidade mecânica foi avaliada utilizando monofilamentos de von Frey. A frequência de remoção ou “retirada” da pata do contato com o fundo gradeado da plataforma de teste, em resposta a 10 aplicações do filamento de von Frey (0,4 g) (Stoelting, Chicago, USA) foi o valor utilizado como indicativo de resposta. No dia anterior a cirurgia os animais foram submetidos ao teste para caracterização da resposta basal. O teste foi aplicado utilizando uma plataforma de 70 x 40 cm, que consiste em uma tela de arame com malha de 6 mm. Para facilitar a aplicação do filamento no aspecto plantar da pata posterior, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação feita em acrílico (9 x 7 x 11 cm) sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre a plataforma (PITCHER; HENRY, 2004). O filamento foi aplicado na pata posterior direita (operada), atendendo alguns critérios como: a aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento obtendo-se assim pressão total; os animais foram avaliados quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela; a resposta de retirada foi considerada quando o animal removeu totalmente a pata da tela de apoio.

### 4.3.4 Envolvimento do Sistema Opióide

Para avaliar o envolvimento do sistema opioide no efeito analgésico da LEDT, diferentes grupos de camundongos submetidos à IP foram pré-tratadas com: (1) uma injeção sistêmica de solução salina (10 ml/kg, i.p.) ou naloxona (um antagonista não seletivo de receptores opioides, 1 mg/kg, i.p.) 20 minutos antes do tratamento com a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) ou morfina (5 mg/kg, s.c.); (2) uma injeção intraplantar (i.pl.) de naloxona (5 µg/pata) ou solução salina (20 µl/pata) na pata traseira direita, 15 minutos antes do tratamento com a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) ou morfina (5 mg/kg, s.c.); ou (3) uma injeção intratecal (i.t.) de naloxona (5 µg/sítio) ou solução salina (5 µl/sítio), 15 minutos antes do tratamento com a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) ou morfina (5 mg/kg, s.c.). A hipersensibilidade mecânica foi avaliada 30 minutos após o tratamento com morfina ou LEDT. As doses de todas as substâncias utilizadas foram escolhidas com base nos dados da literatura (MARTINS et al., 2012).

### **4.3.5 Injeção Intratecal**

A administração das substâncias pela via intratecal (i.t.) foi realizada como descrita anteriormente (HYLDEN; WILCOX, 1980). Para tanto, os camundongos foram contidos manualmente, e uma agulha, conectada por meio de um tubo de polietileno a uma microseringa foi inserida no espaço subaracnóideo da medula espinal (entre as vértebras L5-L6). As injeções foram realizadas durante um período de 5 segundos. O movimento característico de recolher/puxar a cauda foi considerado como indicativo visual de administração correta.

### **4.3.6 Envolvimento de Opióides Liberados por Leucócitos**

Para avaliar o envolvimento de opioides liberados por leucócitos no efeito analgésico da LEDT, camundongos submetidos à IP foram pré-tratados com solução salina (10 ml/kg, i.p.) ou fucoidina (uma droga que se liga fortemente às selectinas bloqueando o rolamento de leucócitos, 100 µg/kg, i.p.) 20 minutos antes do tratamento com a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) (MARTINS et al., 2012). A hipersensibilidade mecânica foi avaliada 30 minutos após o tratamento com a LEDT.

### **4.3.7 Envolvimento da Via L-arginina/óxido nítrico**

Para investigar o papel que a via L-arginina/óxido nítrico na analgesia induzida pela LEDT, camundongos submetidos à IP foram pré-tratados com solução salina (10 ml/kg, i.p.) ou L-arginina (um precursor do óxido nítrico, 600 mg/kg, i.p.) 20 minutos antes do tratamento com a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) ou N<sup>0</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG, um inibidor de óxido nítrico, 75 mg/kg, i.p.), tal como foi previamente descrito (SANTOS et al., 1999). A hipersensibilidade mecânica foi avaliada 30 minutos após o tratamento LEDT ou L-NOARG.

### **4.3.8 Envolvimento do Sistema Adenosinérgico**

Para avaliar o envolvimento do sistema adenosinérgico no efeito analgésico da LEDT, diferentes grupos de camundongos submetidos à IP foram pré-tratadas com: (1) uma injeção sistêmica de solução salina (10 ml/kg, i.p.) ou cafeína (um antagonista não seletivo de receptores adenosinérgicos, 10 mg/kg, i.p.) 20 minutos antes do tratamento com a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) ou adenosina (30 mg/kg, i.p.); (2) uma injeção



intraplantar (i.pl.) de cafeína (150 nmol/pata) ou solução salina (20 µl/pata) na pata traseira direita, 15 minutos antes do tratamento com a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) ou adenosina (30 mg/kg, i.p.); ou (3) uma injeção intratecal (i.t.) de cafeína (150 nmol/sítio) ou solução salina (5 µl/sítio), 15 minutos antes do tratamento com a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) ou adenosina (30 mg/kg, i.p.). A hipersensibilidade mecânica foi avaliada 30 minutos após o tratamento com adenosina ou LEDT.

Em um experimento adicional, para avaliar o envolvimento dos receptores adenosinérgicos A<sub>1</sub> no efeito analgésico da LEDT, diferentes grupos de camundongos submetidos à IP foram pré-tratadas com: (1) uma injeção intraplantar de 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina (DPCPX, um antagonista seletivo de receptores adenosinérgicos A<sub>1</sub>, 10 nmol/pata) ou solução veículo (solução salina com 5% de dimetil sulfoxida, DMSO, a mesma utilizada na diluição do DPCPX - 20 µl/pata) na pata traseira direita, 15 minutos antes do tratamento com a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) ou adenosina (30 mg/kg, i.p.); ou (3) uma injeção intratecal (i.t.) de DPCPX (10 nmol/sítio) ou solução salina (5 µl/sítio), 15 minutos antes do tratamento com a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) ou adenosina (30 mg/kg, i.p.). A hipersensibilidade mecânica foi avaliada 30 minutos após o tratamento com adenosina ou LEDT. As doses das substâncias utilizadas foram escolhidas com base nos dados da literatura (MARTINS et al., 2013).

#### **4.3.9 Envolvimento do Sistema Canabinoide**

Para avaliar o envolvimento dos receptores canabinoides CB<sub>1</sub> no efeito analgésico da LEDT, diferentes grupos de camundongos submetidos à IP foram pré-tratadas com: (1) uma injeção sistêmica de solução veículo (solução salina com 1% de DMSO e 2,5% de álcool etílico, a mesma utilizada para diluição das drogas utilizadas neste experimento - 10 ml/kg, i.p.) ou AM281 (um antagonista seletivo para receptores canabinoides CB<sub>1</sub>, 0,5 mg/kg, i.p.) 20 minutos antes do tratamento com a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) ou anadamida (AEA, um agonista seletivo de receptores CB<sub>1</sub>, 10 mg/kg, i.p.); (2) uma injeção intraplantar (i.pl.) de AM281 (10 µg/pata) ou solução salina (20 µl/pata) na pata traseira direita, 15 minutos antes do tratamento com a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) ou AEA (10 mg/kg, i.p.); ou (3) uma injeção intratecal (i.t.) de AM281 (2 µg/sítio) ou solução salina (5 µl/sítio), 15 minutos antes do tratamento com a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) ou AEA (10 mg/kg, i.p.). A hipersensibilidade mecânica foi avaliada 30 minutos após o tratamento com AEA ou LEDT.

Em um experimento subsequente, para avaliar o envolvimento dos receptores canabinoides CB<sub>2</sub> no efeito analgésico da LEDT, diferentes grupos de camundongos submetidos à IP foram pré-tratados com: (1) uma injeção sistêmica de solução veículo (solução salina com 1% de DMSO e 2,5% de álcool etílico - 10 ml/kg, i.p.) ou AM630 (um antagonista seletivo para receptores canabinoides CB<sub>2</sub>, 3 mg/kg, i.p.) 20 minutos antes do tratamento com a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) ou WIN 55,212-2 (WIN, um agonista misto de receptores canabinoides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, 1,5 mg/kg, i.p.); (2) uma injeção intraplantar (i.pl.) de AM630 (4 µg/pata) ou solução salina (20 µl/pata) na pata traseira direita, 15 minutos antes do tratamento com a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) ou WIN (1,5 mg/kg, i.p.); ou (3) uma injeção intratecal (i.t.) de AM630 (2 µg/sítio) ou solução salina (5 µl/sítio), 15 minutos antes do tratamento com a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) ou WIN (1,5 mg/kg, i.p.). A hipersensibilidade mecânica foi avaliada 30 minutos após o tratamento com WIN ou LEDT. As doses das substâncias utilizadas foram escolhidas com base nos dados da literatura (CALIGNANO; LA RANA; PIOMELLI, 2001; LA RANA et al., 2008; GU et al., 2011; KHASABOVA et al., 2011).

#### 4.4 MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO DA PATA

##### 4.4.1 Protocolo de Indução do Modelo

O modelo de isquemia-reperfusão da pata (IR) foi realizado conforme descrito previamente (MILLECAMPs et al., 2010; BRATTI, 2011). Os camundongos foram anestesiados durante um período de 3 horas, com uma dose inicial de hidrato de cloral (7%, 0,6 ml/kg, i.p.) e suplementos de 20% no fim da primeira e segunda hora. Após a indução da anestesia, a isquemia foi induzida pela colocação de um elástico tipo O-ring de 1,2 milímetros de diâmetro interno (modelo 000-1237, Uniden, Brasil) em torno do tornozelo direito dos animais. Após três horas, o anel foi cortado permitindo a reperfusão. Os animais sham foram anestesiados, mas o elástico não foi utilizado no tornozelo (BRATTI, 2011).

##### 4.4.2 Grupos Experimentais e Tratamento com a LEDT

Os grupos experimentais utilizados durante os experimentos com o modelo de IR da pata (n = 8): sham (anestesiados porém não submetidos à IR), IR (submetidos à IR que não receberam tratamento

com a LEDT) e LEDT (submetidos à IR e tratados com a LEDT na densidade de energia de  $9 \text{ J/cm}^2$ ). Nos experimentos bioquímicos os seguintes grupos foram utilizados: sham, sham+LEDT, IR e IR+LEDT.

A densidade de energia de  $9 \text{ J/cm}^2$  foi escolhida baseada nos resultados obtidos com no modelo de incisão plantar descrito no item 4.3.2. O tratamento foi realizado diretamente sobre a superfície plantar da pata submetida ao procedimento de IR com o dispositivo em contato com a pele do animal.

#### **4.4.3 Avaliação da Hipersensibilidade Mecânica**

A hipersensibilidade mecânica foi avaliada utilizando monofilamentos de von Frey. A frequência de remoção ou “retirada” da pata do contato com o fundo gradeado da plataforma de teste, em resposta a 10 aplicações do filamento de von Frey (0,4 g) (Stoelting, Chicago, USA) foi o valor utilizado como indicativo de resposta. No dia anterior a cirurgia os animais foram submetidos ao teste para caracterização da resposta basal. O teste foi aplicado utilizando uma plataforma de 70 x 40 cm, que consiste em uma tela de arame com malha de 6 mm. Para facilitar a aplicação do filamento no aspecto plantar da pata posterior, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação feita em acrílico (9 x 7 x 11 cm) sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre a plataforma (PITCHER; HENRY, 2004). O filamento foi aplicado na pata posterior direita (operada), atendendo alguns critérios como: a aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento obtendo-se assim pressão total; os animais foram avaliados quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela; a resposta de retirada foi considerada quando o animal removeu totalmente a pata da tela de apoio.

#### **4.4.4 Avaliação da Hipersensibilidade Térmica ao Frio**

Para a avaliação da hipersensibilidade ao frio, os camundongos foram colocados sobre uma plataforma com fundo metálico gradado em caixas de acrílico individuais (9 cm × 7 cm × 11 cm) e habituados durante uma hora. A hipersensibilidade ao frio foi avaliada por meio do teste de spray da acetona no qual 25  $\mu\text{l}$  de acetona é esguichada na superfície plantar da pata posterior dos animais - direita e esquerda individualmente. O tempo que o animal passou erguendo, lambendo ou balançando a pata testada foi considerado como comportamento

nociceptivo e computado durante 2 minutos. Três medições foram feitas e a média para cada pata (direita e esquerda) foi utilizada nas avaliações (SMITH; CRAGER; MOGIL, 2004). As medições foram expressas como delta do tempo de comportamento de cada animal: pata normal menos pata submetida a IR (pata direita menos pata esquerda, respectivamente).

#### **4.4.5 Dosagem de Citocinas**

No 3<sup>o</sup> dia pós-operatório os animais foram avaliados quanto ao desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica (conforme descrito no item 4.4.3) e separados em grupos homogêneos. Os grupos LEDT e Sham+LEDT foram tratados 3 vezes com intervalo de 12 horas entre os tratamentos. Trinta minutos após o último tratamento com a LEDT o tecido da pata posterior direita (pele, músculos e fáscia) de camundongos submetidos ao modelo de IR da pata foi recolhido e utilizado para avaliação dos níveis de citocinas pelo método ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), com valores de amostra corrigida por níveis de proteína (MIZGERD; SPIEKER; DOERSCHUK, 2001). As amostras removidas foram homogeneizadas com PBS contendo tween 20 (0,05 %), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 0,1 mM, EDTA 10,0 mM, aprotinina 2,0 ng/ml e cloreto de benzametônio 0,1 mM. A solução formada foi centrifugada a  $3.000 \times g$  por 10 minutos a 4°C. As alíquotas de amostras de 100 µl foram usadas para determinação dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra e IL-10 utilizando kits de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN), de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância para as citocinas referidas foi medida através de um leitor de microplacas a 450 e 550 nm.

#### **4.4.6 Determinação do Estresse Oxidativo e Sistema Antioxidante**

No 3<sup>o</sup> dia pós-operatório os animais foram avaliados quanto ao desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica (conforme descrito no item 4.4.3) e separados em grupos homogêneos. Os grupos LEDT e Sham+LEDT foram tratados 3 vezes com intervalo de 12 horas entre os tratamentos. Trinta minutos após o último tratamento com a LEDT os tecidos da pata posterior direita (pele, músculos e fáscia) de camundongos submetidos ao modelo de IR foram coletados e utilizados para avaliação de marcadores do estresse oxidativo e dos níveis de enzimas antioxidantes.

Para este ensaio, a formação de espécies reativas ao ácido

tiobarbitúrico (TBARS) foi medida conforme descrito anteriormente (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990). As amostras foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e 1 ml de ácido tiobarbitúrico a 0,67% e foram, então, aquecidas em água durante 15 minutos. Os níveis de TBARS foram determinados pela absorbância a 535 nm. Os resultados foram expressos como equivalentes de malondialdeído (MDA, nmol/mg de proteína).

O dano oxidativo de proteínas foi avaliado por quantificação de grupos carbonilados baseado na reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH), como descrito anteriormente (LEVINE et al., 1994). As proteínas foram precipitadas pela adição de 20% de ácido tricloroacético e foram re-dissolvidas em DNPH, a absorbância foi lida a 370 nm. Os resultados foram relatados como nmol de teor de carbonilados por mg de proteína (nmol/mg de proteína).

Para determinar a atividade da enzima catalase (CAT), os tecidos da pata foram sonicados em tampão fosfato 50 mmol/l (pH 7,0), e a suspensão resultante foi centrifugada a 3000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio da enzima. A atividade da CAT foi medida pela taxa de diminuição da absorbância de peróxido de hidrogênio a 240 nm (AEBI, 1984). Os resultados foram reportados como (U/mg de proteína).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada por medição da inibição da auto-oxidação da adrenalina, como descrito anteriormente (AEBI, 1984). Todos os parâmetros bioquímicos foram normalizados para o teor de proteína, com albumina bovina como padrão. Todos os resultados foram normalizados pela concentração de proteína, medida pelo ensaio de Lowry (AEBI, 1984). Os resultados foram relatados como (U/mg de proteína).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média + E.P.M. A diferença entre os grupos foi obtida pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de *Newnan-Keuls* ou ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguida pelo teste *Bonferroni*, quando apropriado. Valores de p menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados estatisticamente significativos. Para o cálculo estatístico, foi utilizado o software *Graph Pad Prism 5.0b* versão para Mac OS X (La Jolla, CA, Estados Unidos, 2009).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 MODELO DE ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO

#### 5.1.1 Efeito da LEDT na Hipersensibilidade Mecânica

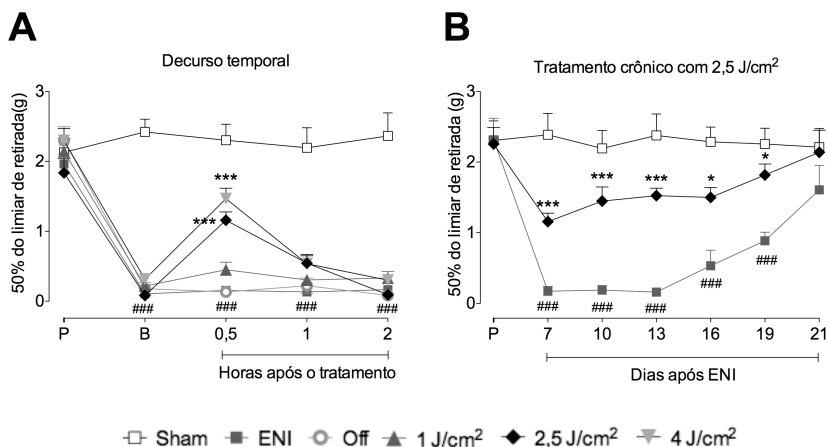
A lesão por ENI induziu desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica na pata ipsolateral dos camundongos operados do 7º ao 19º dia após o procedimento cirúrgico em relação ao grupo sham (Fig. 16 B).

Os resultados apresentados na figura 16 A mostram que a LEDT, irradiada na pele diretamente sobre o local do esmagamento, nas fluências de 2,5 e 4 J/cm<sup>2</sup>, reduziu significativamente a hipersensibilidade mecânica induzida pelo ENI, com efeito por trinta minutos. Os valores de inibição 30 minutos após o tratamento foram de 62 ± 14% para 2,5 J/cm<sup>2</sup>, e 60 ± 8% para a fluência de 4 J/cm<sup>2</sup>. O tratamento com o dispositivo LED desligado (grupo Off), bem como o efetuado com a fluência de um 1 J/cm<sup>2</sup> não reduziram a hipersensibilidade mecânica induzida pelo ENI (Fig. 16 A).

Uma vez que 2,5 J/cm<sup>2</sup> requer menos tempo de irradiação (32 segundos) e seu efeito não diferiu estatisticamente do resultado obtido com a fluência de 4 J/cm<sup>2</sup> (50 segundos de irradiação), os experimentos subsequentes neste modelo foram realizados com a fluência de 2,5 J/cm<sup>2</sup>.

Adicionalmente, o tratamento crônico com LEDT reduziu a hipersensibilidade mecânica induzida pelo ENI em todos os dias de tratamento, com redução máxima de 63 ± 12% no 10º dia pós-operatório (Fig. 16 B).

Figura 16 – Efeito da LEDT na hipersensibilidade mecânica induzida pelo ENI.



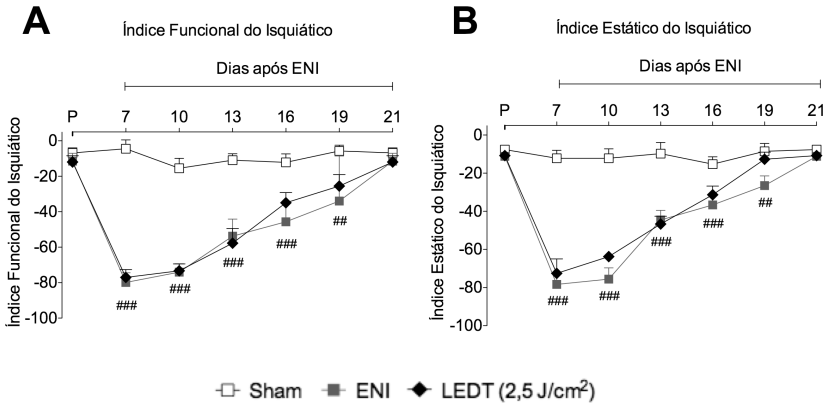
Efeito da LEDT (950 nm, 1, 2,5 e 4 J/cm<sup>2</sup>) sobre a hipersensibilidade mecânica induzida pelo ENI em camundongos. (A) Decurso temporal do efeito do tratamento agudo. (B) Efeito do tratamento crônico. “P” corresponde à avaliação anterior ao procedimento cirúrgico. Os dados são expressos como a média ± EPM, N = 8 animais. \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001 indicam diferença estatística entre o grupo LEDT e o grupo controle não tratado (ENI); ###p<0,001 indica diferença estatística entre o grupo ENI e o grupo sham. A estatística foi realizada por ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo teste Bonferroni.

### 5.1.2 Efeito da LEDT na Recuperação Funcional

A lesão por ENI induziu comprometimento funcional no membro posterior ipsilateral a cirurgia dos camundongos, com função motora gradualmente restaurada durante o período de avaliação, ou seja, a partir do dia 7 até o dia 19 após o esmagamento do nervo.

Os dados apresentados na figura 17 A e B indicam que o tratamento crônico com a LEDT não acelerou a recuperação funcional representada por meio do índice funcional e estático do isquiático (Fig. 17 A e B respectivamente). Tal constatação se deve ao fato de que os resultados obtidos com a LEDT não diferem significativamente dos obtidos com o grupo controle (ENI) que expressam o processo de gradual restauração da função motora que ocorre neste modelo.

Figura 17 – Efeito da LEDT na recuperação funcional do nervo isquiático.



Efeito da LEDT (950 nm, 2,5 J/cm<sup>2</sup>) sobre os (A) índices Funcional e (B) Estático do nervo isquiático em camundongos submetidos ao ENI. “P” corresponde à avaliação anterior ao procedimento cirúrgico; “B” indica avaliação antes do tratamento. Os dados são expressos como a média ± EPM, N = 8 animais. ## p<0,05 e ### p<0,001 indicam diferença estatística entre o grupo ENI e o grupo sham. A estatística foi realizada por ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo teste Bonferroni.

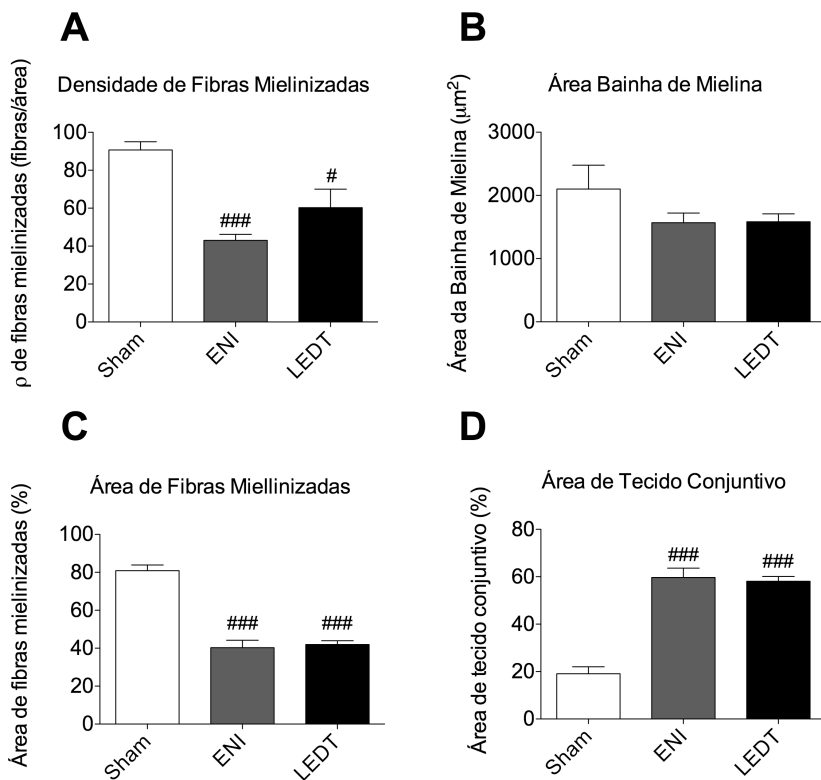
### 5.1.3 Efeito da LEDT na Regeneração Nervosa

A análise morfométrica demonstra que os grupos submetidos ao ENI, em comparação ao grupo sham, apresentaram menor densidade de fibras mielinizadas (Fig. 18 A), embora sem diferença estatística na área da bainha de mielina das fibras remanescentes (Fig. 18 B). A lesão ocasionada pelo esmagamento do nervo isquiático também provocou a redução da área das fibras mielinizadas com aumento correspondente da área do tecido conjuntivo (Fig. 18 C-D).

O tratamento crônico com LEDT (950 nm, 2,5 J/cm<sup>2</sup>) não alterou de maneira significativa qualquer dos parâmetros morfológicos acima referidos (Fig. 18 A-D).



Figura 18 – Efeito da LEDT na regeneração nervosa.



Efeito da LEDT (950 nm, 2,5 J/cm<sup>2</sup>) sobre (A) a densidade de fibras mielinizadas (fibras/área), (B) a área da bainha de mielina (μm), (C) a área de fibras mielinizadas (%) e (D) a área de tecido conjuntivo (%) de camundongos submetidos ao ENI. Os dados são expressos como a média ± EPM, N = 8 animais. <sup>#</sup>p<0,05 e <sup>###</sup>p<0,001 indica diferença estatística entre os grupos ENI ou LEDT e o grupo sham. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste Newman-Keuls.

## 5.2 MODELO DE INCISÃO PLANTAR

### 5.2.1 Efeito da LEDT na Hipersensibilidade Mecânica

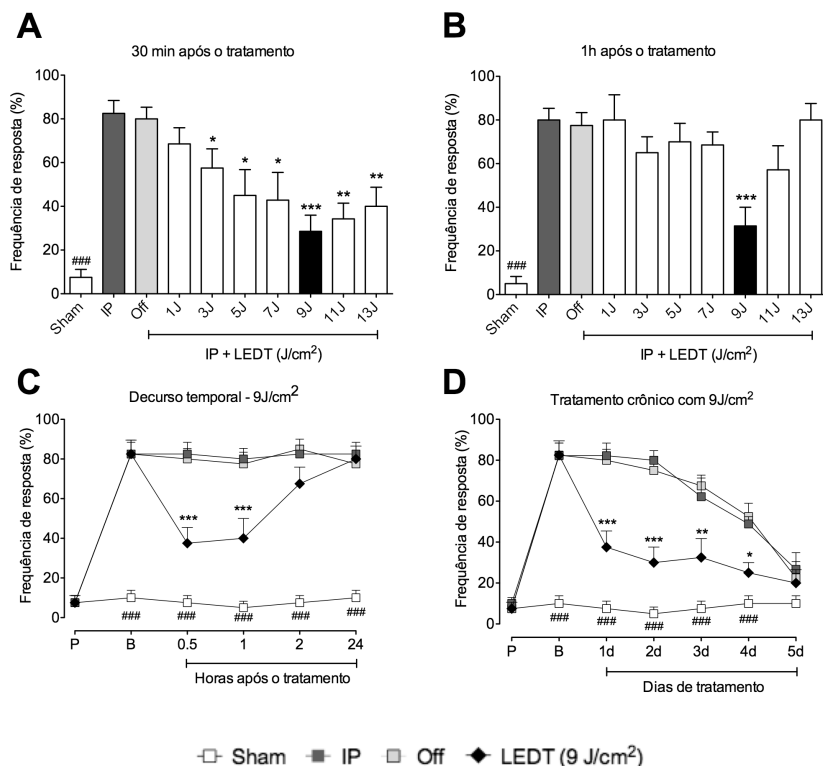
A lesão por Incisão Plantar (IP) induziu desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica na pata ipsilateral dos camundongos operados do 1º ao 4º dia após o procedimento cirúrgico em relação ao grupo sham (Fig. 19 D).

Os resultados representados na figura 19 A demonstram que a LEDT apresentou um efeito antinociceptivo dependente da dose. As doses de 5, 7, 9, 11 e 13 J/cm<sup>2</sup> reduziram de forma significativa ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ ) a hipersensibilidade mecânica induzida pela IP com duração do efeito analgésico de uma hora para 9 J/cm<sup>2</sup> e 30 minutos para as demais doses (Fig. 19 A e B). Os valores de inibição foram 45±14%, 48±15%, 63±9%, 58±9% e 52±11% para 5, 7, 9, 11 e 13 J/cm<sup>2</sup> respectivamente, trinta minutos após o tratamento e 61±11% para 9 J/cm<sup>2</sup> uma hora após o tratamento. Em contraste, a dose de 1 J/cm<sup>2</sup> e o tratamento com o dispositivo de LED desligado não apresentaram efeito antinociceptivo.

Uma vez que resultados mais duradouros foram obtidos com 9 J/cm<sup>2</sup> os experimentos subsequentes foram realizados com esta dose.

Adicionalmente, os dados apresentados na figura 19 D demonstram que o tratamento crônico com a LEDT (9 J/cm<sup>2</sup>) reduziu de forma significativa ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ ) a hipersensibilidade mecânica induzida pela IP em todos os dias de tratamento, com uma inibição máxima de 65±9% no dia 2.

Figura 19 – Efeito da LEDT na hipersensibilidade mecânica induzida pela IP.



Efeito da LEDT (950 nm, 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13 J/cm<sup>2</sup>) sobre a hipersensibilidade mecânica induzida pela IP em camundongos. Resultado da avaliação realizada (A) 30 minutos e (B) 1 hora após o tratamento. Decurso temporal do efeito do tratamento (C) agudo e (D) crônico. “P” corresponde à avaliação anterior ao procedimento cirúrgico; “B” indica avaliação antes do tratamento. Os dados são expressos como a média ± EPM, N = 8 animais. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 indicam diferença estatística entre o grupo LEDT e o grupo controle não tratado; ###p<0,001 indicam diferença estatística entre o grupo controle e o grupo sham. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Newman-Keuls (A e B) ou ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo teste Bonferroni (C e D).

### 5.2.2 Envolvimento do Sistema Opioide

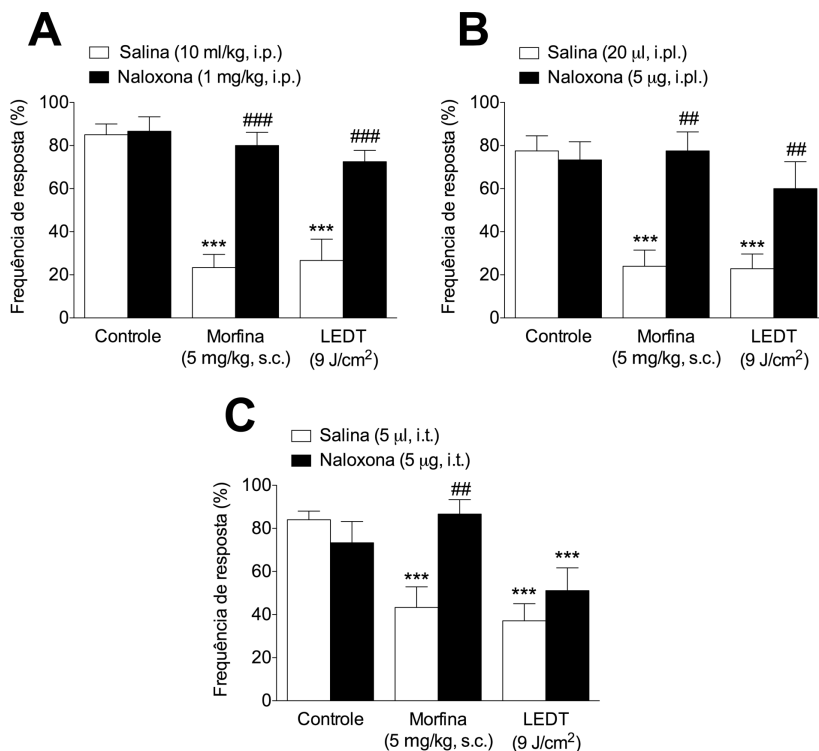
Os dados apresentados na figura 20 (A, B e C) indicam que a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) reduziu significativamente a hipersensibilidade mecânica induzida pela IP em camundongos. Entretanto, a administração prévia de naloxona (um antagonista não seletivo para receptores opioides) inibiu ( $p<0,001$  e  $p<0,05$ ) o efeito analgésico da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) quando administrada por via intraperitoneal (1 mg/kg, Fig. 20 A) ou intraplantar (5 µg/pata, Fig. 20 B) mas não por via intratecal (5 µg/sítio, Fig. 20 C).

Na figura 20 (A, B e C) é possível observar que a morfina (5 mg/kg, s.c.), utilizada como controle positivo, apresentou atividade analgésica neste modelo, tendo reduzido de forma significativa ( $p<0,01$ ) a hipersensibilidade mecânica induzida pela IP.

Ao contrário do resultado obtido com a LEDT, a naloxona quando pré-administrada por via intraperitoneal (1 mg/kg, Fig. 20 A), intraplantar (5 µg/pata, Fig. 20 B) e também por via intratecal (5 µg/sítio, Fig. 20 C), inibiu de forma significativa ( $p<0,001$  e  $p<0,01$ ) o efeito analgésico obtido com a aplicação de morfina (5 mg/kg, s.c.).

A administração de naloxona nas diferentes vias e doses utilizadas no presente estudo não causou nenhum efeito per se na nocicepção induzida pela incisão plantar quando comparado com o grupo que recebeu veículo.

Figura 20 – Envolvimento do sistema opioide no efeito antinociceptivo da LEDT.



Efeito da pré-administração de naloxona sobre a atividade antinociceptiva da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) e da morfina (5 mg/kg, s.c.) após IP em camundongos. Naloxona administrada por via intraperitoneal (i.p., 1 mg/kg, A); intraplantar (i.pl., 5µg, B) e intratecal (i.t., 5 µg, C). Os dados são expressos como a média ± EPM, N = 8 animais. \*\*\*p<0,001 indica diferença estatística entre os grupos tratados (LEDT ou morfina) e o grupo controle não tratado; ##p<0,01 e ###p<0,001 indicam diferença estatística entre o tratamento e naloxona + tratamento. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Newman-Keuls.

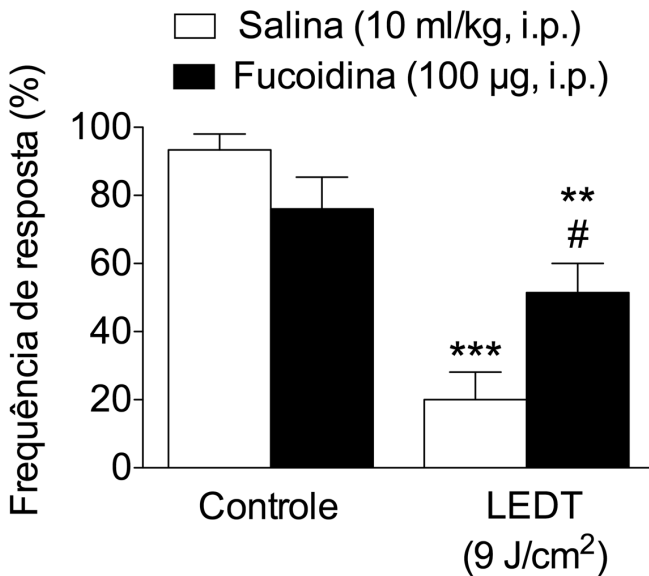
### 5.2.3 Envolvimento de Opioides liberados por Leucócitos

Os resultados apresentados na figura 21 indicam que a LEDT

(950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) reduziu significativamente a hipersensibilidade mecânica induzida pela IP em camundongos e que a pré-administração sistêmica de fucoidina (100 µg/kg, i.p., uma droga que se liga fortemente às selectinas bloqueando o rolamento de leucócitos) inibiu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o efeito analgésico da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>).

No entanto, a administração de fucoidina *per se* não afetou de forma significativa ( $p > 0,05$ ) a hipersensibilidade mecânica induzida pela IP quando comparada com o grupo controle (Fig. 21).

Figura 21 – Envolvimento de opioides liberados por leucócitos no efeito antinociceptivo da LEDT.

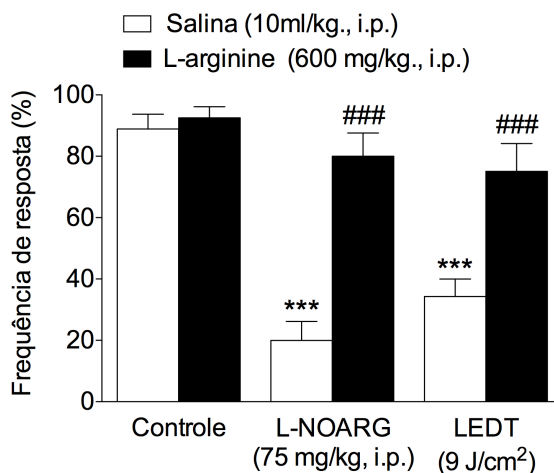


Efeito da pré-administração sistêmica de Fucoïdina (100 µg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) após IP em camundongos. Os dados são expressos como a média ± EPM, N = 8 animais. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  indicam diferença estatística em relação ao grupo controle não tratado; # $p < 0,05$  indica diferença estatística entre o grupo LEDT e o grupo fucoïdina + LEDT. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Newman-Keuls.

### 5.2.4 Envolvimento da via L-arginina/óxido nítrico

Os resultados apresentados na figura 22 demonstram que o tratamento com a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) reduziu a hipersensibilidade mecânica induzida pela IP em camundongos e que tal efeito foi inibido de forma significativa (p<0,001) pela pré-administração sistêmica de L-arginina (600 mg/kg, i.p., um precursor do NO). Por outro lado, a L-NOARG (75 mg/kg, i.p., inibidor da enzima NO sintase), utilizada como controle positivo, reduziu (p<0,001) a hipersensibilidade mecânica induzida pela IP em camundongos e, de forma semelhante ao ocorrido com a LEDT, a pré-administração sistêmica de L-arginina (600 mg/kg, i.p.) inibiu significativamente a atividade antinociceptiva da L-NOARG.

Figura 22 - Envolvimento da via L-arginina/óxido nítrico no efeito antinociceptivo da LEDT.



Efeito da pré-administração de L-arginina (600 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) e da L-NOARG (75 mg/kg, i.p.). Os dados são expressos como a média ± EPM, N = 8 animais. \*\*\*p<0,001 indica diferença estatística entre grupos tratados (LEDT ou L-NOARG) e o grupo controle não tratado; ###p<0,001 indica diferença estatística entre o tratamento (LEDT ou L-NOARG) e L-arginina + tratamento. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Newman-Keuls.

### 5.2.5 Envolvimento do Sistema Adenosinérgico

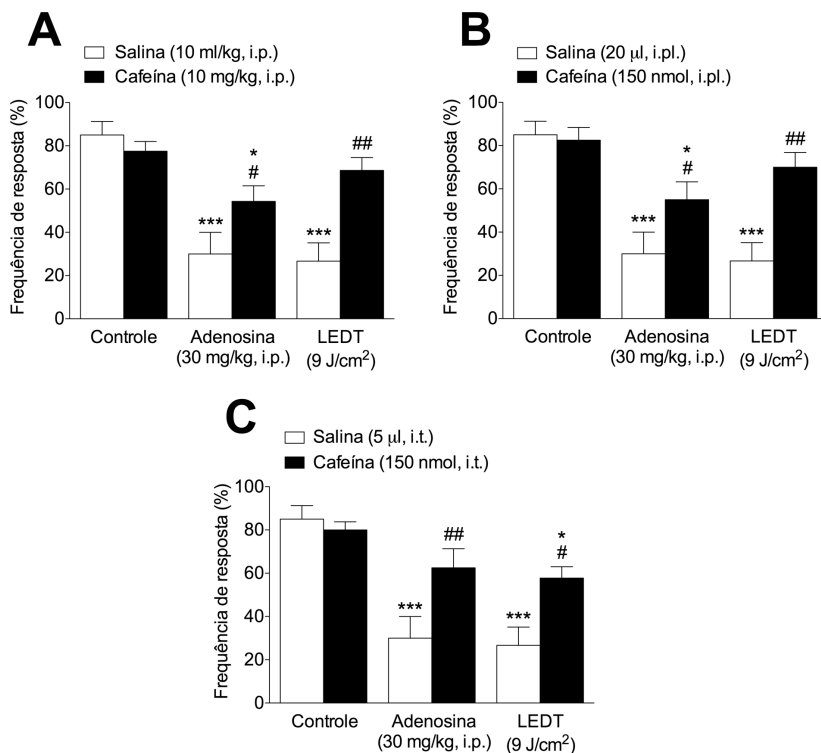
Os dados apresentados na figura 23 (A, B e C) indicam que o tratamento com a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) reduziu de forma significativa ( $p < 0,001$ ) a hipersensibilidade mecânica induzida pela IP e que a administração prévia de cafeína (um antagonista não seletivo dos receptores adenosinérgicos) inibiu de forma significativa o efeito da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) quando administrada por via intraperitoneal (10 mg/kg, Fig. 23 A), intraplantar (150 nmol/pata, Fig. 23 B) ou por via intratecal (150 nmol/sítio, Fig. 23 C).

Além disso, pode-se constatar na figura 23 (A, B e C) que a adenosina (30 mg/kg, i.p.), utilizada como controle positivo, apresentou atividade antinociceptiva reduzindo a hipersensibilidade mecânica induzida pela IP em camundongos, atividade esta inibida pela pré-administração de cafeína administrada por via intraperitoneal (10 mg/kg, Fig. 23 A), intraplantar (150 nmol/pata, Fig. 23 B) ou intratecal (150 nmol/sítio, Fig. 23 C), de forma semelhante aos resultados obtidos com a LEDT.

A administração de cafeína nas diferentes vias e doses utilizadas no presente estudo não causou nenhum efeito per se na nocicepção induzida pela incisão plantar quando comparado com o grupo que recebeu veículo.



Figura 23 – Envolvimento do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo da LEDT.



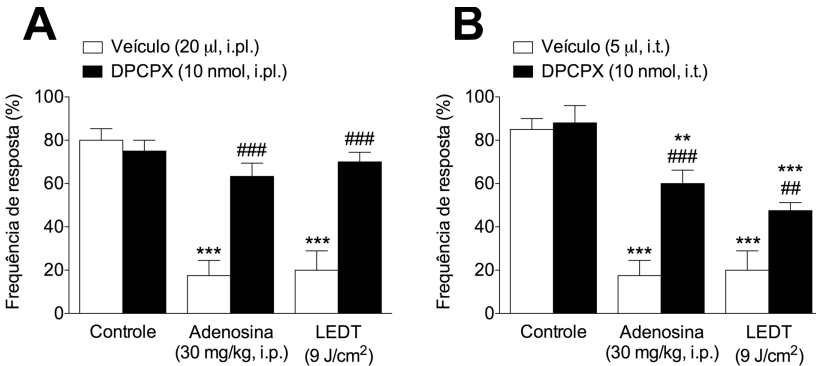
Efeito da pré-administração de cafeína (antagonista não seletivo dos receptores adenosinérgicos) sobre a atividade antinociceptiva da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) e da adenosina (30 mg/kg, i.p.) após IP em camundongos. Cafeína administrada por via intraperitoneal (i.p., 10 mg/kg, A); intraplantar (i.pl., 150nmol/pata, B) e intratecal (i.t., 150nmol/sítio, C). Os dados são expressos como a média ± EPM, N = 8 animais. \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001 indicam diferença estatística em relação ao grupo controle não tratado; #p<0,05 e ###p<0,001 indica diferença estatística entre tratamento (LEDT ou adenosina) e cafeína + tratamento. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Newman-Keuls.

Adicionalmente, os resultados apresentados na figura 24 demonstram que o pré-tratamento dos animais submetidos à IP com

DPCPX (um antagonista seletivo para receptores de adenosina  $A_1$ ) seja por via intraplantar (i.pl., 10 nmol/pata, Fig. 24 A) ou intratecal (i.t., 10 nmol/sítio, Fig. 24 B) inibiu de maneira significativa a analgesia induzida tanto pela LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) quanto pela adenosina (30 mg/kg, i.p., utilizada como controle positivo) no modelo de dor pós-operatória induzida pela IP em camundongos.

A administração de DPCPX nas diferentes vias e doses utilizadas no presente estudo não causou nenhum efeito *per se* na nocicepção induzida pela incisão plantar quando comparado com o grupo que recebeu veículo.

Figura 24 – Envolvimento dos receptores  $A_1$  adenosinérgicos no efeito antinociceptivo da LEDT.



Efeito da pré-administração de DPCPX (antagonista seletivo para receptores para adenosina  $A_1$ ) sobre a atividade antinociceptiva da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) e adenosina (30 mg/kg, i.p.) após IP em camundongos. DPCPX administrada por via intraplantar (i.pl., 10 nmol/pata, A) e intratecal (i.t., 10 nmol/sítio, B). Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM, N = 8 animais. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  indicam diferença estatística em relação ao grupo controle não tratado; ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  indicam diferença estatística entre o tratamento (LEDT ou adenosina) e DPCPX + tratamento. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Newman-Keuls.

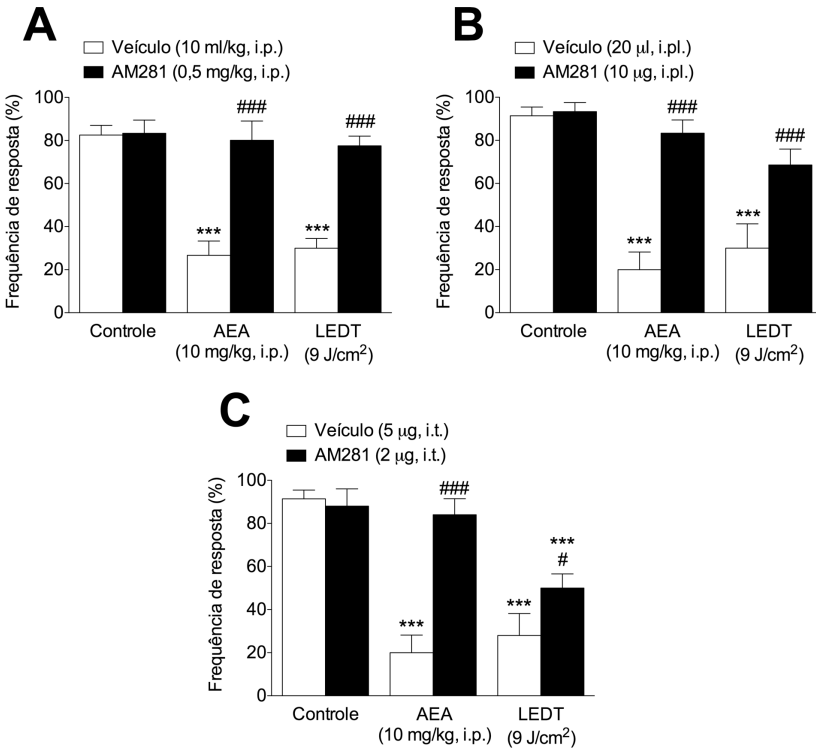
### 5.2.6 Envolvimento do Sistema Canabinoide

Os dados apresentados na figura 25 (A, B e C) indicam que a LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) reduziu significativamente a hipersensibilidade mecânica induzida pela IP em camundongos e que a administração prévia de AM281 (um antagonista seletivo para receptores canabinoides CB<sub>1</sub>) inibiu de forma significativa o efeito da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) quando administrado por via intraperitoneal (0,5 mg/kg, Fig. 25 A), intraplantar (10 µg/pata, Fig. 25 B) e intratecal (2 µg/sítio, Fig. 25 C).

Além disso, a anandamida (AEA, um agonista seletivo de receptores canabinoides CB<sub>1</sub>, 10 mg/kg, i.p.), utilizada como controle positivo, de forma similar à LEDT reduziu a hipersensibilidade mecânica induzida pela IP, com efeito analgésico inibido pela pré-administração de AM281 pela via intraperitoneal (0,5 mg/kg, Fig. 25 A), intraplantar (10 µg/pata, Fig. 25 B) ou intratecal (2 µg/sítio, Fig. 25 C).

A administração de AM281 nas diferentes vias e doses utilizadas no presente estudo não causou nenhum efeito *per se* na nocicepção induzida pela incisão plantar quando comparado com o grupo que recebeu veículo.

Figura 25 – Envolvimento dos receptores  $CB_1$  canabinoides no efeito antinociceptivo da LEDT.



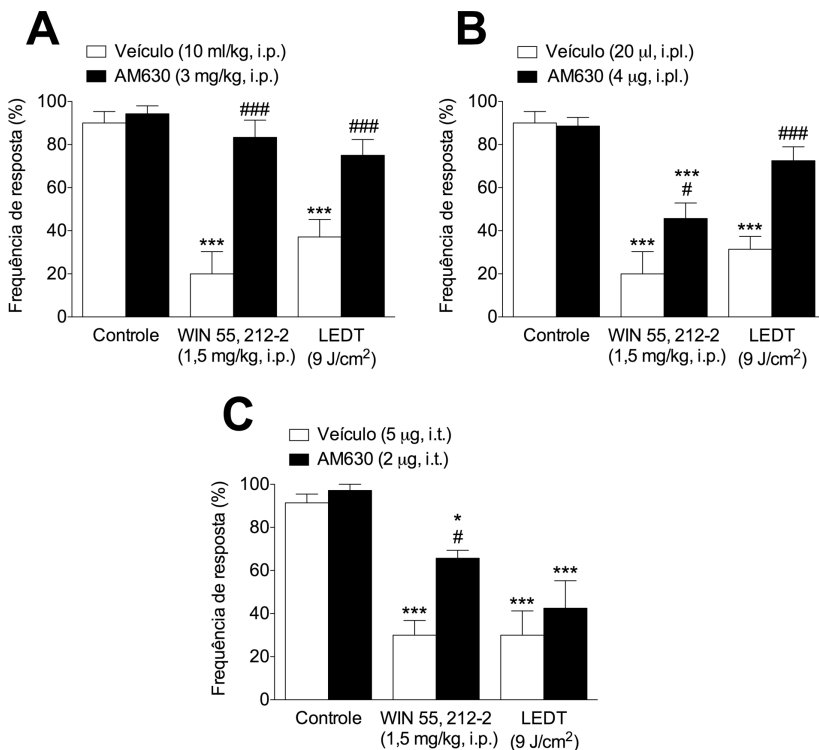
Efeito da pré-administração de AM281 (antagonista seletivo de receptores canabinoides  $CB_1$ ) sobre a atividade antinociceptiva da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) e anandamida (AEA - agonista seletivo de receptores  $CB_1$ , 10 mg/kg, i.p.) após IP em camundongos. AM281 administrada por via intraperitoneal (i.p., 0,5 mg/kg, A) intraplantar (i.pl., 20 µl/pata, B) e intratecal (i.t., 5 µl/sítio, C). Os dados são expressos como a média ± EPM, N = 8 animais. \*\*\*p<0,001 indica diferença estatística em relação ao grupo controle não tratado; #p<0,05 e ###p<0,001 indicam diferença estatística entre o tratamento (LEDT ou AEA) e AM281 + tratamento. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Newman-Keuls.

Adicionalmente, a figura 26 indica que a pré-administração de AM630 (um antagonista seletivo para receptores canabinoides CB<sub>2</sub>) inibiu de forma significativa o efeito da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) na hipersensibilidade mecânica induzida pela IP em camundongos, quando administrado por via intraperitoneal (3 mg/kg, Fig. 26 A) e intraplantar (4 µg/pata, Fig. 26 B) mas não por via intratecal (2 µg/sítio, Fig. 26 C).

O AM630, entretanto, inibiu de forma significativa ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ ) o efeito antinociceptivo do WIN 55, 212-2 (agonista misto de receptores canabinoides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, 1,5 mg/kg, i.p.), utilizado como controle positivo, no modelo de IP em camundongos, quando administrado por via intraperitoneal (3 mg/kg, Fig. 26 A), intraplantar (4 µg/pata, Fig. 26 B) e intratecal (2 µg/sítio, Fig. 26 C).

A administração de AM630 nas diferentes vias e doses utilizadas no presente estudo não causou nenhum efeito per se na nocicepção induzida pela incisão plantar quando comparado com o grupo que recebeu veículo.

Figura 26 – Envolvimento dos receptores CB<sub>2</sub> canabinoides no efeito antinociceptivo da LEDT.



Efeito da pré-administração de AM630 (antagonista seletivo de receptores canabinoides CB<sub>2</sub>R) sobre a atividade antinociceptiva da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) e WIN 55,212-2 (um agonista misto de receptores canabinoides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, 1,5 mg/kg, i.p.) após IP em camundongos. AM630 administrada por via intraperitoneal (i.p., 3 mg/kg, A), intraplantar (i.pl., 4 µl/pata, B) e intratecal (i.t., 2 µl/sítio, C). Os dados são expressos como a média ± EPM, N = 8 animais. \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001 indicam diferença estatística em relação ao grupo controle não tratado; #p<0,05 e ###p<0,001 indica diferença estatística entre o tratamento (LEDT ou WIN 55,212-2) e AM630 + tratamento. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Newman-Keuls.

### 5.3 MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO DA PATA

#### 5.3.1 Efeito da LEDT na Hipersensibilidade Mecânica e ao Frio

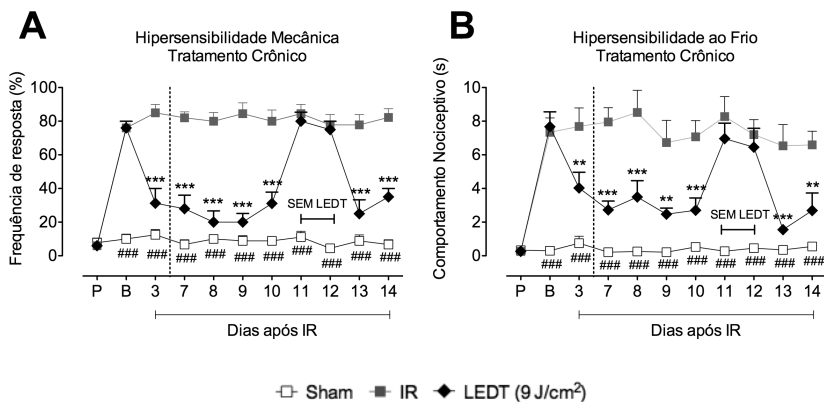
Os resultados apresentados na Fig. 27 A e B demonstram que a lesão induzida pela IR da pata levou ao desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica, bem como térmica ao frio que persistiu durante todo o período de avaliação ( $p < 0,001$ , IR vs grupo sham).

O tratamento com a LEDT (950 nm,  $9 \text{ J/cm}^2$ ) reduziu significativamente a hipersensibilidade mecânica ( $p < 0,001$  - Fig. 27 A), bem como térmica ao frio ( $p < 0,01$  ou  $p < 0,001$  - Fig. 27 B) induzida pela IR em todos os dias de tratamento: PO dia 3, 7 e 10, e, em seguida, novamente nos dias 13 e 14, quando o tratamento foi retomado após uma interrupção de dois dias.

A duração do efeito antinociceptivo da LEDT, tanto na hipersensibilidade mecânica quanto térmica, foi de 1 hora quando avaliado nos dias 3 (efeito após um único tratamento - Fig. 28 A e C) e 10 (efeito após 8 tratamentos com um tratamento diário - Fig. 28 B e D) pós-IR.

Durante a interrupção do tratamento (dias 11 e 12), a resposta dos animais frente ao estímulo mecânico e térmico retornou ao patamar de resposta observado no grupo IR, indicando ausência de efeito antinociceptivo persistente ou residual do tratamento ( $p > 0,05$ ).

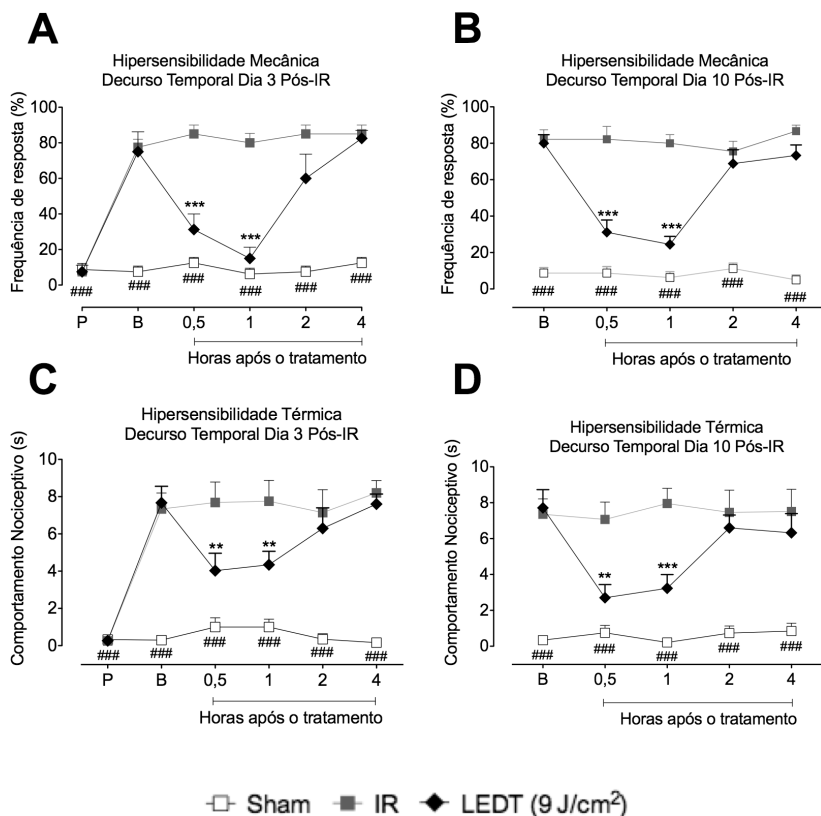
Figura 27 – Efeito da LEDT na hipersensibilidade mecânica e ao frio induzida pela IR.



Efeito da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) sobre a hipersensibilidade mecânica (A) e térmica ao frio (B) induzida pela IR em camundongos. “P” corresponde à avaliação anterior ao procedimento cirúrgico; “B” indica avaliação antes do tratamento. Os dados são expressos como a média ± EPM, N = 8 animais. \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 indicam diferença estatística entre os grupos LEDT e controle não tratado; ###p<0,001 indica diferença estatística entre os grupos controle e sham. A estatística foi realizada por análise de variância de duas vias (ANOVA) para medidas repetidas seguida pelo teste Bonferroni.



Figura 28 – Decurso temporal do efeito da LEDT na hipersensibilidade mecânica e frio induzida pela IR.



Efeito da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) sobre a hipersensibilidade mecânica no (A) dia 3 e (B) 10 pós-operatório. Efeito da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) sobre a hipersensibilidade térmica no (C) dia 3 e (D) 10 pós-operatório (D). “P” corresponde à avaliação anterior ao procedimento cirúrgico; “B” indica avaliação antes do tratamento. Os dados são expressos como a média ± EPM, N = 8 animais. \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 indicam diferença estatística entre os grupos LEDT e IR; ###p<0,001 indica diferença estatística entre os grupos IR e sham. A estatística foi realizada por análise de variância de duas vias (ANOVA) para medidas repetidas seguida pelo teste Bonferroni.

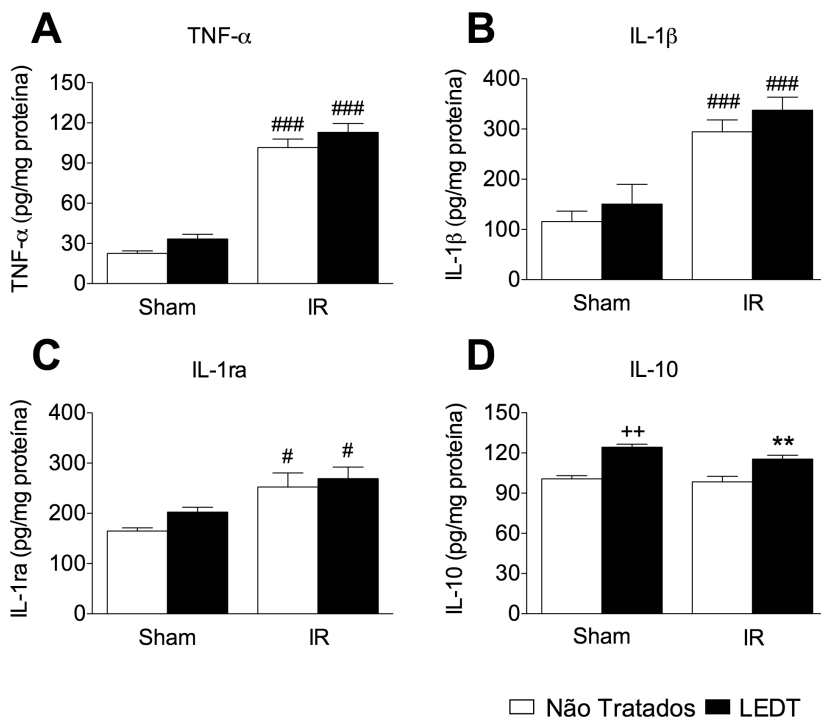
### 5.3.2 Efeito da LEDT sobre Citocinas Pró e Anti-inflamatórias

Os dados apresentados na Fig. 29 demonstram que os animais do grupo IR, em comparação com o grupo sham, apresentaram maiores níveis de TNF- $\alpha$  (Fig. 29 A,  $p < 0,001$ ), IL-1 $\beta$  (Fig. 29 B,  $p < 0,001$ ), e IL-1ra (Fig. 29 C,  $p < 0,05$ ), embora a IR não tenha influenciado os níveis de IL-10 nos tecidos da pata (Fig. 29 D,  $p > 0,05$ ) quando analisado no terceiro dia após a IR.

Em relação ao grupo IR não tratado, a LEDT aumentou significativamente os níveis de citocinas anti-inflamatórias de IL-10 (Fig. 29 D,  $p < 0,05$ ). Além disso, a LEDT aumentou os níveis de IL-10 em animais sham (Fig. 29 D,  $p < 0,05$ ).

O tratamento com LEDT não teve efeito sobre os níveis de citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nem sobre a citocina anti-inflamatória IL-1ra.

Figura 29 – Efeito da LEDT sobre citocinas pró e anti-inflamatórias



Efeito da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) sobre os níveis de citocinas nos tecidos da pata de camundongos submetidos à IR: TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-1 RA (C) e IL-10 (D). Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM, N = 8 animais. \*\*p<0,01 indica diferença estatística entre os grupos LEDT e IR não tratado; #p<0,05 e ###p<0,001 indicam diferença estatística entre os grupos IR ou LEDT e o grupo sham; ++p<0,01 indica diferença estatística entre o grupo sham e o grupo de animais sham tratados com a LEDT (D). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Newman-Keuls.

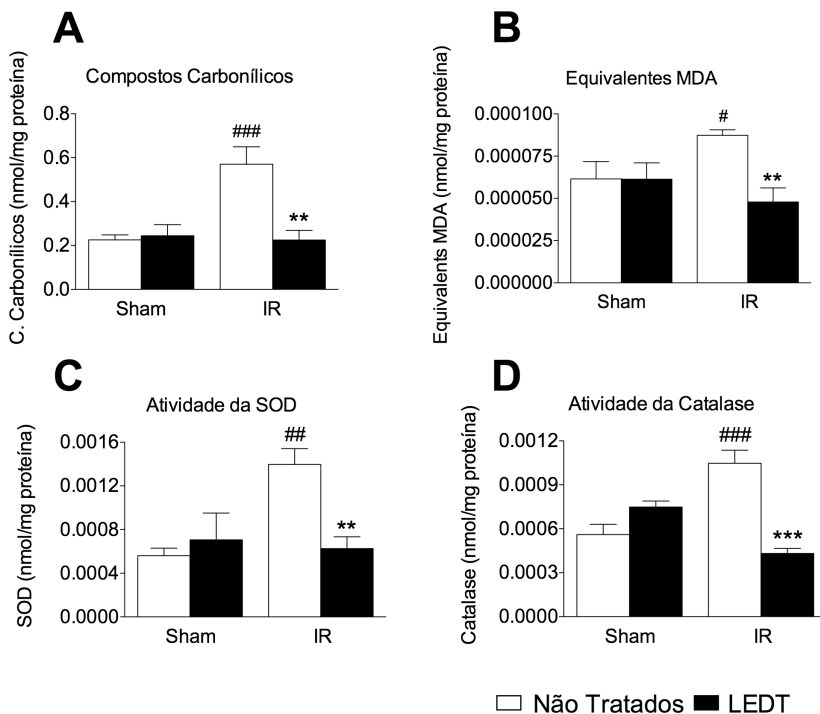
### 5.3.3 Efeito da LEDT sobre o Estresse Oxidativo e o Sistema Antioxidante

Os resultados apresentados na Fig. 30 demonstram que a IR induziu um aumento dos níveis de compostos carbonilados (Fig. 30 A, p<0,001) e de equivalentes de MDA (Fig. 30 B, p<0,01), bem como da

atividade da SOD (Fig. 30 C,  $p < 0,01$ ) e CAT (Fig. 30 D,  $p < 0,001$ ).

Em relação ao grupo IR, a LEDT reduziu significativamente os níveis de compostos carbonilados (Fig. 30 A,  $p < 0,001$ ), e equivalentes de MDA (Fig. 30 B,  $p < 0,01$ ), bem como da enzima antioxidante SOD (Fig. 30 C,  $p < 0,01$ ) e da atividade da CAT (Fig. 30 D,  $p < 0,001$ ).

Figura 30 – Efeito da LEDT no estresse oxidativo e sistema antioxidante.



Efeito da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) sobre os níveis de (A) compostos carbonilados, (B) equivalentes MDA, (C) SOD e (D) Catalase no tecido da pata de camundongos submetidos à IR. Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM, N = 8 animais. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  indicam diferença estatística entre os grupos LEDT e IR não tratado; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  indicam diferença estatística entre o grupo IR e sham. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Newman-Keuls.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 PARÂMETROS DA LEDT UTILIZADOS NESTE ESTUDO

Em fototerapia a escolha correta dos parâmetros de irradiação, que envolvem a seleção do comprimento de onda e dosimetria apropriadas, é essencial para a obtenção do efeito terapêutico (ENWEMEKA, 2009).

Apesar das particularidades de cada caso, de uma maneira geral, a lei de Arndt-Schultz provê a base teórica para a determinação da dosimetria. Tal lei postula que em densidades de irradiação mais baixas ocorre a bioestimulação, e que de maneira inversa, em densidades de irradiação mais altas, ocorre a bioinibição (BAXTER, 2003; TÚNER, 2004). Desta forma, doses muito ínfimas não seriam suficientes para promover efeitos biológicos importantes, e o incremento da densidade de energia, para além de um determinado limiar, poderia danificar os fotoceptores, com conseqüente redução do metabolismo (KARU, 1987). Assim, em conformidade com essa lei, ainda que de forma geral, estudos indicam que a bioestimulação ocorre em densidades de energia entre 0,5 e 10 J/cm<sup>2</sup> (O'KANE et al., 1994; YU; NAIM; LANZAFAME, 1997; SCHINDL et al., 2003). Importante salientar que tais estudos foram feitos a partir de resultados obtidos com LASER de baixa intensidade, entretanto, sugere-se que tais mecanismos são universais para os diferentes tipos de fototerapia de baixa intensidade, como é o caso da LEDT (VINCK et al., 2003; 2005; 2006; BAROLET, 2008). No presente estudo as doses em J/cm<sup>2</sup> que inibiram de forma significativa a hipersensibilidade mecânica nos modelos de nocicepção investigados ficaram entre 2,5 e 13 J/cm<sup>2</sup>, aproximadamente dentro da janela de bioestimulação descrita por Arndt-Schultz.

Em relação a outro parâmetro importante na fototerapia, o comprimento de onda de 950 nm foi selecionado para este estudo devido a sua penetração ideal nos tecidos (dentro da “janela terapêutica” para fototerapia, 600 a 1200 nm) (NIEMZ, 2007). Nesta gama espectral (600-1200 nm), a LEDT modula a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno, promove a angiogênese, estimula macrófagos e linfócitos, melhora o metabolismo energético mitocondrial e promove a produção de fatores de crescimento (EELLS et al., 2004; DESMET et al., 2006). Adicionalmente, foi demonstrado que a LEDT no comprimento de onda de 950 nm com uma dose de 1,07 J/cm<sup>2</sup>, quando aplicada em um ponto médio na pele intacta que cobre o curso do nervo sural, reduziu a velocidade de condução nervosa resultando numa diminuição do número

de impulsos por unidade de tempo (VINCK et al., 2005). Estas atividades fotobiológicas da LEDT no comprimento de onda de 950 nm sobre a condução do nervo sensorial sugerem um possível efeito no alívio da dor. Corroborando esta teoria, foi recentemente demonstrado que a LEDT no comprimento de onda de 950 nm induziu analgesia em um estudo realizado com 30 pacientes com dor no ombro decorrentes de tendinopatias (MONTES-MOLINA et al., 2012). Investigações adicionais sobre o efeito analgésico de diferentes comprimentos de onda e doses poderiam ajudar a determinar os melhores parâmetros para o tratamento de diferentes tipos de dor.

## 6.2 EFEITO DA LEDT NA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA PELO ENI

Esta primeira fase de experimentos, conduzidas com o modelo de dor neuropática induzido pelo ENI em camundongos, teve como objetivo responder às seguintes questões: (1) a LEDT é eficaz contra a dor neuropática? (2) este efeito é dose-dependente? (3) o tratamento na menor dose analgésica encontrada acelera a recuperação da função motora e estimular a regeneração nervosa após o esmagamento do nervo?

Os resultados aqui apresentados demonstram, pela primeira vez, que a LEDT (950 nm, 80 mW/cm<sup>2</sup>, 2,5 J/cm<sup>2</sup>) (1) é eficaz contra a dor neuropática, tendo reduzido significativamente a hipersensibilidade mecânica induzida pelo ENI em camundongos, (2) este efeito analgésico é do tipo dose dependente e não induz tolerância, (3) o tratamento crônico com a dose analgésica de 2,5 J/cm<sup>2</sup>, não acelerou a recuperação da função motora, nem estimulou a regeneração nervosa após lesão por ENI.

É de relevância neste estudo a demonstração do efeito da LEDT na redução da hipersensibilidade mecânica, sinal representativo de dor neuropática em modelos animais de neuropatias periféricas (NPs) (KONTINEN; MEERT, 2002). Tal importância se deve ao fato das NPs estarem entre os problemas neurológicos de incidência mais comuns (ENGLAND; ASBURY, 2004). Entretanto, poucas terapias e intervenções estão disponíveis para impedir ou reverter os danos associados (FINNERUP et al., 2005). Adicionalmente, a grande maioria das NPs é acompanhada pelo desenvolvimento de dor neuropática, geralmente crônica, incapacitante e em grande parte resistente aos tratamentos farmacológicos (DWORKIN et al., 2003; ATTAL et al., 2010), que frequentemente produzem efeitos colaterais indesejáveis ou

analgesia inadequada (NIEDERBERGER; KUHLEIN; GEISLINGER, 2008).

Neste contexto, é de fundamental importância o desenvolvimento de terapias que possam auxiliar no tratamento das NPs e/ou das dores neuropáticas associadas, em especial de terapias não invasivas, de baixo custo e que não produzam efeitos adversos, como é o caso da LEDT.

O fato da LEDT ter apresentado um efeito analgésico do tipo dose dependente está de acordo com a lei de Arndt-Schultz, que afirma que a bioestimulação ocorre em doses entre 0,5 e 10 J/cm<sup>2</sup> (O'KANE et al., 1994; YU; NAIM; LANZAFAME, 1997; SCHINDL et al., 2003). Estudos com a LLLT também sugerem um padrão de dose-resposta (BJORDAL; COUPPÃ; LJUNGGREN, 2001; KHADRA, 2005; SHARMA et al., 2011). Esta observação é de extrema relevância, já que a eficácia do tratamento pode ser altamente influenciada pela escolha adequada dos parâmetros de estimulação, tal como aqui foi demonstrado no caso da “dose” de tratamento. Tal fenômeno também foi observado no modelo de IP (Fig. 19) que faz parte desta tese.

É importante ressaltar que o tratamento crônico com a LEDT não induziu tolerância durante o período experimental, uma vez que diminuiu a hipersensibilidade mecânica em todos os dias de tratamento (Fig. 16). Tal fato também foi observado nos modelos de incisão plantar (Fig. 19) e isquemia e reperfusão da pata (Fig. 27) que fazem parte desta tese. Tal constatação é importante pelo fato que o tratamento da dor de origem neuropática, por exemplo, que não é sensível a terapias de primeira linha, ser geralmente limitado aos opioides, os quais são eficazes quando administrados de forma aguda, mas frequentemente diminuem sua eficácia após a administração crônica, sendo este efeito denominado de tolerância (LARGENT-MILNES et al., 2008).

Por fim, cabe destacar que o efeito analgésico da LEDT não pode ser atribuído ao estresse induzido pela contenção durante o tratamento, já que o procedimento com o dispositivo desligado não afetou o limiar de sensibilidade dos animais (Fig. 16 - Grupo Off e ainda Fig. 19 na série de experimentos com o modelo de IP).

### **6.2.1 Efeito da LEDT Sobre a Recuperação Funcional e Regeneração Nervosa**

Os resultados aqui apresentados demonstram que a irradiação crônica diária com LEDT (950 nm, 2,5 J, por 15 dias), não acelerou a recuperação funcional expressa pelo índice estático e funcional do nervo isquiático (Fig. 17), nem tampouco estimulou a regeneração nervosa,

fato este demonstrado na análise morfológica (Fig. 18). Apesar da LEDT ter aumentado a densidade de fibras mielinizadas, o resultado não foi estatisticamente significativo ( $37 \pm 2\%$ , Fig. 18).

Estes dados diferem dos obtidos com a regeneração do tendão calcâneo em ratos ( $640 \text{ nm}$ ,  $20 \text{ J/cm}^2$ ) (BASTOS; LIZARELLI; PARIZOTTO, 2009; CASALECHI et al., 2009), bem como com regeneração morfofuncional em ratos submetidos ao ENI ( $940 \text{ nm}$ ,  $9.5 \text{ mW}$ ,  $4 \text{ J/cm}^2$ ) (SERAFIM et al., 2012). Tais resultados aparentemente contraditórios do efeito regenerativo da LEDT são provavelmente devido às diferenças nos parâmetros de irradiação utilizados nesses estudos, especialmente nas doses de  $20$  e  $4 \text{ J/cm}^2$ , respectivamente, que são mais intensas do que os  $2,5 \text{ J/cm}^2$  utilizados nesta tese.

Desta forma, na dose utilizada no presente estudo, os efeitos observados estão relacionados mais a um efeito analgésico do que a uma atividade regeneradora da terapia.

A partir dos dados aqui apresentados conclui-se que a LEDT ( $950 \text{ nm}$ ,  $80 \text{ mW/cm}^2$ ,  $2,5 \text{ J/cm}^2$ ) (1) é eficaz contra a dor neuropática induzida pelo ENI em camundongos, (2) este efeito analgésico é do tipo dose dependente e não induz tolerância, (3) o tratamento crônico com a dose analgésica de  $2,5 \text{ J/cm}^2$ , não acelerou a recuperação da função motora, nem estimular a regeneração nervosa após lesão por ENI.

Tais resultados podem servir de subsídio para investigações mais aprofundadas do efeito da LEDT no tratamento da dor neuropática.

### 6.3 EFEITO DA LEDT NA DOR PÓS-OPERATÓRIA INDUZIDA PELA IP

Dadas as semelhanças entre a LLLT e a LEDT, e com base no fato de que analgesia induzida pela LLLT é codificada por, entre outras substâncias endógenas, peptídeos opioides (PERES E SERRA; ASHMAWI, 2010; BIAN; YU; LIU, 1989; HONMURA et al., 1993; WEDLOCK; SHEPHARD, 1996; FERREIRA et al., 2005; HAGIWARA et al., 2007; 2008) assim como pelo óxido nítrico (NO) (HUANG et al., 2004; MORIYAMA et al., 2005; 2009; GOMES; DALMARCO; ANDRE, 2012; SONG; ZHOU; CHEN, 2012), o objetivo desta série de experimentos foi o de investigar no modelo de dor pós-operatória induzida pela IP em camundongos se o efeito analgésico da LEDT seria mediado pela ativação de receptores opioides; pela liberação de opioides endógenos liberados por leucócitos no local da PI; bem como pela ativação da via L-arginina/óxido nítrico. Adicionalmente, a participação dos sistemas adenosinérgico (receptores



A<sub>1</sub>) e canabinoide (receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>) tanto em nível medular como periférico no efeito analgésico da LEDT foi investigada.

Os dados obtidos apontam evidências a favor do uso da LEDT no tratamento da dor pós-operatória, bem como contribuem para o conhecimento geral sobre os mecanismos endógenos deste efeito, uma vez que demonstram, pela primeira vez, que (1) a LEDT apresenta um efeito analgésico do tipo dose dependente neste modelo; (2) que tal efeito é mediado pela ativação de receptores opioides periféricos (4) envolvendo, ao menos em parte, a participação de opioides endógenos derivados de leucócitos recrutados para o tecido lesionado e (5) com a participação da via L-arginina/NO/cGMP. Além disso, o efeito analgésico da LEDT envolve (6) a ativação, tanto em nível medular como no local da IP de receptores A<sub>1</sub> adenosinérgicos e CB<sub>1</sub> canabinoides, bem como de CB<sub>2</sub> canabinoides em nível periférico.

O fato da LEDT ter sido eficaz contra a dor pós-operatória, mesmo que em um modelo animal, é especialmente relevante. De acordo com o Centro Nacional de Estatísticas de Saúde, 46 milhões de americanos submetidos a procedimentos cirúrgicos por ano sofrem de dor cirúrgica aguda (INSTITUTE OF MEDICINE COMMITTEE ON ADVANCING PAIN RESEARCH AND EDUCATION, 2011). Em uma pesquisa americana sobre a dor pós-operatória, 59% dos pacientes relataram preocupação com a dor no pós-operatório e 80% destes classificaram a dor que sentiram de aguda moderada a grave nas primeiras horas ou dias após a cirurgia (APFELBAUM et al., 2003).

Apesar dos esforços por parte de profissionais da saúde e pesquisadores, o tratamento da dor pós-operatória permanece inconsistente e tem profundas implicações sobre a qualidade de vida dos pacientes (APFELBAUM et al., 2003). As terapias complementares têm se demonstrado eficazes para o tratamento desta modalidade de dor, tal como a manipulação articular do tornozelo (MARTINS et al., 2012; 2013); a acupuntura (WARD; NILSSON, 2013), a massoterapia (MITCHINSON et al., 2007) e a LLLT. A LLLT especificamente, induziu analgesia em casos de dor pós-operatória resultantes de intervenções dentárias diversas (KREISLER et al., 2004; SABER; CHINIFORUSH; SHAHABI, 2012) e de cirurgia plástica (JACKSON; ROCHE; MANGIONE, 2009), no entanto, este estudo é a primeira evidência da eficácia da LEDT para o tratamento da dor pós-operatória proveniente de um procedimento cirúrgico.

### 6.3.1 Participação do Sistema Opioide

Muitos estudos têm sugerido importantes efeitos biomodulatórios da terapia fotônica de baixa intensidade em processos inflamatórios, na cicatrização de tecidos e no alívio da dor, entretanto a base molecular destes efeitos permanece obscura (MORIYAMA et al., 2005).

Os opioides endógenos são um componente importante do sistema antinociceptivo (BRUEHL et al., 2012) que exercem os seus efeitos fisiológicos por ação sobre os receptores opioides, que são largamente expressos no sistema nervoso central e periférico, bem como em numerosos tecidos não neuronais (KAPITZKE; VETTER; CABOT, 2005).

Está bem estabelecido que muitas terapias complementares podem aumentar a liberação de opioides endógenos, principalmente  $\beta$ -endorfina, que por sua vez reduz a dor. Exemplos dessas terapias são: a atividade física, a acupuntura, a massagem do tecido conjuntivo, a crioterapia e a eletroterapia, dentre outros (BENDER et al., 2007).

Adicionalmente, diversos estudos relatam evidências do envolvimento de receptores opioides periféricos na analgesia induzida pela LLLT (BIAN; YU; LIU, 1989; HONMURA et al., 1993; WEDLOCK; SHEPHARD, 1996; FERREIRA et al., 2005; HAGIWARA et al., 2007; 2008; PERES E SERRA; ASHMAWI, 2010), entretanto, o presente trabalho é o primeiro a demonstrar que a analgesia induzida pela LEDT também é mediada por receptores opioides periféricos.

Esta observação é baseada no fato que a administração prévia de naloxona (um antagonista não seletivo para receptores opioides) inibiu de forma significativa o efeito da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) na hipersensibilidade mecânica induzida pela IP em camundongos, quando administrada de forma sistêmica (intraperitoneal) ou no local da cirurgia (intraplantar), mas não por via espinal (intratecal) (Fig. 20). É importante observar que contrariamente ao resultado obtido com a LEDT, a naloxona quando pré-administrada por via intraperitoneal, intraplantar e também por via intratecal, foi eficaz em reverter o efeito antinociceptivo da morfina.

Uma vez que todas as três classes principais de receptores opioides ( $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ ) estão presentes em terminais dos nervos sensoriais periféricos em animais e em seres humanos (STEIN; LANG, 2009), são necessários estudos adicionais para determinar qual (is) receptor (es) é (estão) envolvido na analgesia induzida pela LEDT.

Outra constatação do presente estudo foi a demonstração de que o efeito analgésico da LEDT foi parcialmente inibido pela pré-administração de fucoidina (Fig. 21), uma droga que se liga fortemente às selectinas bloqueando o rolamento de leucócitos e consequentemente reduzindo seu acúmulo no sítio inflamatório (STEIN; LANG, 2009). Tal constatação contribui para a hipótese de que a LEDT atua por meio da ativação de receptores de opioides endógenos, neste caso específico, com envolvimento direto de opioides endógenos liberados por leucócitos. Vale ressaltar que esta é a primeira demonstração de tal mecanismo mediando a ação analgésica da fototerapia.

Em tecidos lesionados ou inflamados, como no caso da pata submetida à IP, numerosos mediadores hiperalgésicos são produzidos (BRACK et al., 2004), no entanto, a hipersensibilidade é parcialmente reduzida por um sistema local de analgesia que envolve peptídeos opioides liberados por leucócitos (STEIN; LANG, 2009). O recrutamento de leucócitos para sítios sistêmicos inflamados *in vivo* é iniciado pela adesão endotelial mediada por selectinas. Quando leucócitos são ativados por mediadores locais em condições inflamatórias, eles secretam peptídeos opioides, que se ligam a receptores opioides periféricos em neurônios sensoriais e causam analgesia (STEIN; MACHELSKA, 2011). Mais especificamente, todas as diferentes famílias de peptídeos opioides são encontradas em leucócitos (endorfinas, encefalinas e dinorfinas), sendo que esses peptídeos podem se ligar a todos os três receptores opioides clássicos, com diferentes afinidades (RITTNER; MACHELSKA; STEIN, 2005). Além disso, demonstrou-se que o controle da dor pós-operatória por peptídeos opioides derivados do sistema imune é clinicamente aparente logo após a cirurgia (BRACK et al., 2004), o que indica que este sistema está ativo num período de tempo extremamente curto.

Estudos adicionais são necessários para elucidar o papel de receptores opioides específicos e para verificar os mecanismos exatos por meio dos quais a LEDT atua no sistema opioide; se por aumento da expressão de receptores ou incremento na liberação de opioides endógenos no local da lesão.

### **6.3.2 Participação dos Sistemas Adenosinérgico e Canabinoide**

Os resultados aqui apresentados indicam uma participação do sistema adenosinérgico no efeito analgésico da LEDT, uma vez que a administração de cafeína (um antagonista não seletivo para receptores adenosinérgicos) inibiu o seu efeito (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>) na

hipersensibilidade mecânica induzida pela IP em camundongos, quando administrada de forma sistêmica (intraperitoneal), no local da cirurgia (intraplantar) e ainda por via espinal (intratecal) (Fig. 23).

Mais especificamente, sugere-se que o efeito analgésico da LEDT depende da ativação tanto periférica quanto espinal de receptores adenosinérgicos do subtipo  $A_1$ , já que o pré-tratamento dos animais submetidos à IP com DPCPX (um antagonista seletivo para receptores para adenosina  $A_1$ ) nos diferentes sítios avaliados (i.pl., fig. 24 A ou i.t., fig. 24 B) inibiu de maneira significativa a analgesia causada pela LEDT.

Em conformidade com estes dados, sabe-se que a adenosina regula a transmissão da dor na periferia e na medula espinal, particularmente por ativação dos receptores adenosinérgicos do tipo  $A_1$ , que são os subtipos de receptores adenosinérgicos com ação antinociceptiva mais bem caracterizada (SAWYNOK; LIU, 2003). Tal observação é reforçada no presente trabalho pela demonstração que a adenosina (30 mg/kg, i.p.) induziu importante efeito analgésico no modelo de IP, sendo que esse efeito foi inibido pela pré-administração de DPCPX tanto por via intraplantar quando intratecal.

Não há dados específicos na literatura sobre o envolvimento do sistema adenosinérgico nos efeitos analgésicos da LLLT, entretanto, sabe-se que diversos agentes podem alterar a disponibilidade extracelular de adenosina e subsequentemente diminuir a transmissão da dor (SAWYNOK; LIU, 2003), incluindo o tratamento com terapias integrativas, tal como a acupuntura (GOLDMAN et al., 2010). Os mecanismos exatos por meio dos quais a LEDT exerce seu efeito analgésico via receptores  $A_1$  adenosinérgicos precisam ser ainda elucidados.

Adicionalmente, a administração prévia de AM281 (um antagonista seletivo para receptores canabinoides  $CB_1$ ) inibiu o efeito da LEDT (950 nm, 9 J/cm<sup>2</sup>), bem como da AEA (10 mg/kg, i.p.) na hipersensibilidade mecânica induzida pela IP, quando administrada por via intraperitoneal, intraplantar e intratecal (Fig. 25). Tais resultados indicam, pela primeira vez, que a ativação de receptores canabinoides  $CB_1$ , parece estar envolvida no efeito analgésico da LEDT, tanto na periferia quanto na medula espinal.

É importante ressaltar que em modelos experimentais de dor aguda, inflamatória e neuropática (DOGRUL et al., 2002; HOHMANN; SUPLITA, 2006; GUNDUZ; KARADAG; ULUGOL, 2011), bem como no tratamento de pacientes com dores de origem neuropática (GROTHENHERMEN; MULLER-VAHL, 2012; WILSEY et al., 2013) e

em estágios avançados de câncer dentre outros quadros algícos (JOHNSON et al., 2012), agonistas de receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> demonstraram importante ação analgésica. Tal efeito é confirmado pela evidência do efeito analgésico induzido pela administração dos agonistas de receptores canabinoides AEA (10 mg/kg, i.p.) e WIN 55,212-2 (1,5 mg/kg, i.p.) no presente estudo.

Por outro lado, o efeito analgésico da LEDT foi inibido pela administração prévia de AM630 (um antagonista seletivo para receptores canabinoides CB<sub>2</sub>) quando injetado por via intraperitoneal e intraplantar, mas não por via intratecal, o que indica que o efeito analgésico da LEDT é mediado por receptores CB<sub>2</sub> predominantemente periféricos (Fig. 26). Tal observação pode ser elucidada pelo fato de tais receptores serem mais amplamente expressos na periferia do que na medula espinal (IBRAHIM et al., 2005; KHASABOVA et al., 2011). É importante observar que contrariamente ao resultado obtido com a LEDT, o AM630 quando pré-administrado por via intraperitoneal, intraplantar e também por via intratecal, foi eficaz em reverter o efeito antinociceptivo do WIN 55,212-2.

A partir do conjunto dos resultados obtidos nos experimentos farmacológicos com os sistemas endógenos de controle da dor, sugere-se que o efeito analgésico da LEDT envolva uma complexa interação entre os sistemas aqui investigados.

Várias linhas de evidência indicam que os receptores opioides e canabinoides podem interagir funcionalmente no sistema nervoso central (SNC). Estas interações podem ser diretas, como por meio da heteromerização de receptores, ou indiretas, como por meio de sinalização cross-talk, que inclui liberação e/ou síntese de ligantes endógenos mediadas por agonistas que podem por sua vez ativar receptores ao longo da via de sinalização (CICHEWICZ, 2004). Por exemplo, canabinoides, como  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol (THC) estimulam a liberação de opioides endógenos, que podem também ser afetada pela anandamida (AEA) (WELCH, 2009). De maneira inversa, a micro-injeção de morfina ampliou a antinocicepção induzida por agonista canabinoide (HU-210) um dia após a administração (WILSON-POE et al., 2013). Como os opioides e canabinoides se ligam a receptores distintos que se co-localizam em áreas encefálicas envolvidas no processamento de sinais dolorosos, é lógico se supor que possíveis interações entre estes dois sistemas atuem na modulação da dor aguda e crônica (WELCH, 2009). Adicionalmente, um estudo bastante interessante sugere que o sistema canabinoide quando ativado pode estimular a liberação de opioides endógenos, mais especificamente; no

caso da ativação do receptor CB<sub>2</sub> que estimula a liberação de β-endorfina em queratinócitos. A β-endorfina liberada pode atuar em receptores opioides locais inibindo a nocicepção. Importante lembrar que os queratinócitos são encontrados em grande quantidade na pele, que no caso do modelo de IP é afetada pela incisão (IBRAHIM et al., 2005).

Além disso, sabe-se que os agonistas opioides podem estimular o sistema adenosinérgico induzindo analgesia, por exemplo, a administração de morfina pode estimular receptores opioides espinhais a efetuar a liberação de adenosina que, por sua vez, atua em receptores adenosinérgicos induzindo analgesia (SANDNER-KIESLING; LI; EISENACH, 2001). De fato, consequências relevantes das interações entre adenosina e os opioides podem ser observadas no controle da dor neuropática (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009). Notavelmente em ratos com dor neuropática, a liberação de adenosina induzida por morfina se encontra reduzida (SANDNER-KIESLING; LI; EISENACH, 2001). Uma vez que a liberação de adenosina induzida pela morfina contribui para o controle da dor devido às ações antinociceptivas da ativação dos receptores A<sub>1</sub>, uma diminuição na liberação de adenosina neste caso pode explicar a diminuição da eficácia e potência de opioides no tratamento da dor neuropática (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009).

Há pouca informação disponível sobre as interações entre os sistemas canabinoide e adenosinérgico no que tange ao controle endógeno da dor, entretanto, sugere-se que receptores adenosinérgicos poderiam estar envolvidos no efeito analgésico da AEA, uma vez que a pré-administração espinal de cafeína inibiu o potencial anti-hiperalgésico da AEA no modelo de inflamação induzida por carragenina (TUBOLY et al., 2009). Desta forma, um agonista canabinoide (AEA) poderia estar modulando positivamente a ativação dos receptores adenosinérgicos induzindo analgesia.

Com base nestas informações, sugere-se que a LEDT possa exercer seu efeito analgésico por meio de uma complexa interação entre os sistemas endógenos aqui estudados, e provavelmente entre outros não abordados neste estudo. Para citar apenas um exemplo das complexas interações que podem ocorrer entre sistemas, sabe-se que a AEA atua como um inibidor não competitivo de receptores serotoninérgicos 5HT<sub>3</sub> e receptores nicotínicos de acetilcolina (OZ, 2006), inibe diretamente canais de Na<sup>+</sup> sensíveis à voltagem (KIM et al., 2005) e influencia canais de glicina (HEJAZI et al., 2006). Além disso, é provável que outros receptores ligados a proteínas G também estejam envolvidos em

algumas das ações de AEA (HAJOS; LEDENT; FREUND, 2001) que pode influenciar sistemas endógenos diversos (TUBOLY et al., 2009).

Neste contexto, é desnecessário mencionar que estudos adicionais são necessários para que o mecanismo de ação da LEDT no controle da dor seja completamente elucidado. De toda forma, os mecanismos aqui apresentados podem servir de guia para investigações futuras.

Uma pergunta pertinente que poderia surgir a partir da observação dos dados supramencionados poderia ser: “como pode a LEDT exercer efeitos em sítios medulares ou supra-medulares quando irradiada na periferia?” Em resposta a esta pergunta primeiramente pode-se afirmar que tal atuação já está comprovada, ao menos no que diz respeito a outra modalidade de fototerapia, no caso a LLLT. Para tanto, pode-se citar o exemplo de estudos que demonstraram por meio de ressonância magnética funcional (fMRI, do inglês functional magnetic resonance imaging) e tomografia por emissão de pósitrons (PET, do inglês positron emission tomography) que o estímulo com a LLLT - que não produz sensação de toque ou aquecimento na pele - estimula estruturas corticais e subcorticais com especificidade de pontos (acupontos na Medicina Tradicional Chinesa) estimulados. Por exemplo, a estimulação pela LLLT de um ponto de acupuntura no pé, classicamente utilizado para o tratamento de problemas visuais, provocou a ativação do córtex occipital (SIEDENTOPF et al., 2002). Interessante observar que nestes experimentos áreas do córtex somatosensorial não foram ativadas (SIEDENTOPF et al., 2002; 2005; QUAH-SMITH; TANG; RUSSELL, 2005; QUAH-SMITH et al., 2010), o que é consistente com a observação de que a estimulação com laser de baixa intensidade não produz qualquer sensação perceptível na pele, no local da estimulação.

Uma possível forma de atuação central a partir de um estímulo luminoso na periferia seria por meio da estimulação de mediadores endógenos na periferia (agonistas opioides como as endorfinas, por exemplo). Tais substâncias quando liberadas poderiam alcançar o sistema nervoso central (SNC), no caso de serem moléculas capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica, e a partir daí atuariam em receptores localizados em regiões supra-espinais. Tal mecanismo, entretanto, dependeria de uma produção acentuada destes mediadores para que os mesmos pudessem atuar em sítios não locais e carece ainda de investigação.

Outra hipótese seria por meio de ativação direta ou indireta de receptores localizados em nervos sensoriais. Corroborando a teoria de que o estímulo luminoso aplicado em regiões cutâneas periféricas

poderia desencadear repostas em sítios medulares ou supra-medulares, recentemente foi publicado um estudo na revista *Nature Chemical Biology* (KOKEL et al., 2013) que demonstrou que os efeitos comportamentais ativados pela optovina, uma pequena molécula que permite a fotoativação repetida de comportamentos motores em peixes-zebra e em camundongos, não é mediada pelo sistema visual, mas sim por meio de neurônios sensoriais que expressam o canal catiônico receptor de potencial transitório ankirina 1 (TRPA1, do inglês *Transient Receptor Potential Ankyrin 1*). A saber, os canais TRPA1 participam de processos sensoriais, como sensação de frio e audição, além de exercerem um papel funcional na dor e inflamação de origem neurogênica (GUIMARÃES; JORDT, 2007). No caso específico, a optovina ativa os canais TRPA1 humano via uma estrutura dependente de reações fotoquímicas com resíduos de cisteína redox-sensíveis. Em animais com medulas espinais decepadas, o tratamento com optovina permite o controle da atividade motora nas extremidades paralisadas por meio de estimulação luminosa localizada. Estes estudos identificam uma estratégia baseada na estimulação fotônica (luz) para controlar os receptores TRPA1 endógenos in vivo, com potencial para aplicações clínicas e de pesquisa em animais, incluindo seres humanos.

Apesar de não haver estudos desta natureza com LEDT, tais experimentos servem de exemplo do efeito central, no caso específico supra-espinhal, da estimulação de áreas cutâneas com terapia fotônica de baixa intensidade (luz). Desta forma, tais argumentos podem servir de base para futuros estudos sobre os efeitos centrais da LEDT.

### **6.3.3 Participação da via L-arginina/óxido nítrico**

O NO é um importante mensageiro intracelular, que age como molécula mensageira no aumento da transmissão nociceptiva no sistema nervoso central com consequente indução da hiperalgesia e alodinia. (KIM et al., 2007). Além disso, o NO é um mediador potente da inflamação sintetizado pela síntese do NO (NOS) em várias partes do corpo, incluindo em alguns neurônios e macrófagos (GOMES; DALMARCO; ANDRE, 2012).

Os resultados aqui obtidos confirmam tal hipótese, uma vez que a administração de L-NOARG (75 mg/kg, i.p., inibidor da enzima NO sintase) reduz a hipersensibilidade mecânica induzida pela IP em camundongos, e que a pré-administração sistêmica de L-arginina (600 mg/kg, i.p., um precursor do NO) previne este efeito (Fig. 22).

Vários estudos demonstram que a terapia fotônica de baixa



intensidade reduz a expressão de NO de uma forma dependente da dose (MORIYAMA et al., 2009; GOMES; DALMARCO; ANDRE, 2012; HUANG; LU; KAO, 2012; SONG et al., 2012). Em consonância com estes dados, os resultados aqui apresentados sugerem que um dos mecanismos possíveis da analgesia induzida pela LEDT seja a diminuição dos níveis de NO no processo inflamatório (local da IP), uma vez que o efeito da LEDT foi inibido pela pré-administração de L-arginina.

Alternativamente, partindo-se da hipótese de que os efeitos da fotoestimulação são em grande parte mediados pelo aumento da atividade do citocromo c oxidase (HU et al., 2007), liberação de NO (KARU; PYATIBRAT; AFANASYEVA, 2005) e um aumento dos níveis de ATP (PASSARELLA et al., 1984; PASTORE et al., 1996); um grande aumento nos níveis de NO (como no caso da administração de L-arginina), poderia perturbar este processo e impedir a ativação do citocromo c oxidase pela LEDT, impedindo seu efeito terapêutico. Estudos mais detalhados são necessários a fim de confirmar estas hipóteses, entretanto, os resultados aqui apresentados fortemente sugerem a participação da via do NO no efeito analgésico da LEDT no modelo da IP em camundongos.

Em conclusão, os resultados apresentados nesta segunda série de experimentos demonstram, pela primeira vez, que a LEDT (950 nm, 80 mW/cm<sup>2</sup>) induziu um efeito analgésico do tipo dose dependente no modelo de PI em camundongos. Na densidade de energia de 9 J/cm<sup>2</sup> a LEDT apresentou os resultados mais significativos por meio (1) da ativação de receptores opioides periféricos envolvendo, ao menos em parte, o recrutamento de opioides secretados por leucócitos no sítio da IP, (2) a ativação da via L-arginina/óxido nítrico e finalmente, (3) a ativação, tanto em nível medular, como no local da IP, de receptores A<sub>1</sub> adenosinérgicos e CB<sub>1</sub> canabinoides, bem como de CB<sub>2</sub> canabinoides em nível periférico.

Estes resultados estendem dados da literatura sobre o efeito analgésico da LEDT e sugerem que esta terapia possa ser um complemento interessante e de baixo custo para o tratamento da dor pós-operatória.

#### 6.4 EFEITO DA LEDT NO MODELO DE SDCR-I INDUZIDA POR IR

A terceira fase de experimentos que compõem esta tese foi realizada com o modelo de SDCR-I induzida por isquemia-reperfusão

da pata em camundongos com o objetivo de investigar o efeito analgésico, anti-inflamatório e antioxidativo da LEDT. Nesta série de experimentos, a mesma dose de tratamento da série de experimentos anteriores de  $9 \text{ J/cm}^2$  foi utilizada.

As principais observações desta fase foram que a LEDT (1) reduziu significativamente os sinais comportamentais de hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio, (2) estimulou um aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 e (3) induziu a diminuição dos níveis de marcadores de estresse oxidativo (carbonilação de proteínas e equivalentes MDA) e do sistema antioxidante enzimático (superóxido dismutase e catalase).

Uma vez que não existem medicamentos específicos aprovados para o tratamento da SDCR-I; e nenhum protocolo comprovado está disponível para uso com estes pacientes (TAHA; BLAISE, 2012) apesar dos vários métodos disponíveis, incluindo a terapia física, a calcitonina, os corticosteróides, o bloqueio simpático, e os AINEs (ROBINSON; SANDOM; CHAPMAN, 2004); o estudo de terapias complementares ao seu tratamento é de relevância clínica.

Neste contexto, o fato da LEDT ter sido eficaz contra a hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio é de interesse clínico por levantar um precedente que justificaria o investimento em pesquisas com pacientes acometidos pela síndrome. Adicionalmente, por se tratarem de modalidades sensoriais diversas com mecanismos neurais subjacentes diferentes, os resultados positivos tanto na redução da hipersensibilidade mecânica quanto térmica ao frio sugerem a ativação de populações diferentes de receptores, fibras neuronais, bem como vias de dor (HUANG et al., 2004; NEZIRI et al., 2011). No entanto, são necessários estudos adicionais para determinar os mecanismos neuronais subjacentes da analgesia induzida pela LEDT nestas diferentes modalidades sensoriais.

As características que ocorrem após isquemia-reperfusão no modelo animal de IR da pata (lesão vascular, isquemia crônica e de hipersensibilidade) são semelhantes às descritas em pacientes com SDCR-I. Os membros afetados pela síndrome apresentam aumento de citocinas pró-inflamatórias nos fluidos obtidos em bolhas e ulcerações (GROENEWEG et al., 2006), bem como alterações vasculares (WASNER et al., 1999), agregação de leucócitos (TAN; OYEN; GORIS, 2005), isquemia crônica (KOBAN et al., 2003) e degeneração de fibras nervosa de pequeno calibre (ALBRECHT et al., 2006).

Além disso, tem sido demonstrado que animais com dor pós-isquemia crônica apresentam um perfil muito semelhante ao do

verificado em pacientes acometidos da síndrome, com um período inicial sensível a fármacos anti-inflamatórias e morfina (até o 7<sup>o</sup> dia pós-IR), e posteriormente, apresentando características similares a pacientes com dor neuropática (a partir do dia 7<sup>o</sup> dia pós-IR), no qual se desenvolve uma resistência a estes tratamentos (CODERRE et al., 2004). Mais especificamente, ratos expostos a IR prolongada da pata exibem, em uma fase inicial, hiperemia e extravasamento de plasma na pata isquêmica; e posteriormente, de forma crônica, sintomas semelhantes aos apresentados em modelos de dor neuropática, incluindo a hiperalgesia a estímulo mecânico nocivo e térmico ao frio, bem como alodinia mecânica, mas não ao calor na pata submetida à isquemia, e em menor grau, na pata contralateral (CODERRE et al., 2004; BRATTI, 2011).

Os dados aqui apresentados indicam que a atividade analgésica da LEDT foi observada na fase inicial ou inflamatória (ver dia 3 pós-IR na fig. 27), bem como na fase posterior ou tipo dor neuropática da lesão induzida por IR (a partir do dia 7<sup>o</sup> dia pós-IR). Estes dados são consistentes com estudos que apontaram o efeito da LEDT em modelos experimentais de inflamação (XAVIER et al., 2010; OSHIMA et al., 2011; CAMARGO et al., 2012; CHANG et al., 2012; FONSECA et al., 2013), bem como confirmam indiretamente os resultados obtidos com o modelo de dor neuropática induzida pelo de ENI do presente estudo.

É importante salientar que existe uma relação direta entre a disfunção microvascular (presente no modelo IR) e a dor patológica, uma vez que níveis elevados de EROs, NFκB (fator de transcrição nuclear kappa B) e citocinas pró-inflamatórias produzem lesão de células endoteliais vasculares, desencadeando a disfunção microvascular, ao passo que, inversamente, quando estas substâncias se encontram reduzidas, a hipersensibilidade mecânica é atenuada (LAFERRIERE et al., 2008).

Os radicais livres são conhecidos por serem capazes de induzir alterações químicas e moleculares no DNA, em nucleotídeos, proteínas, lipídeos, hidrocarbonetos e na estrutura da membrana celular (SLATER, 1984). Desta forma, sabe-se que os marcadores de estresse oxidativo se encontram elevados em muitas doenças, entretanto, a associação mais expressiva é com a inflamação (CODERRE; BENNETT, 2010). Aumentos na atividade de enzimas antioxidantes e níveis de peroxidação lipídica são consistentes com aumento dos níveis de estresse oxidativo (BLAKE; KROGER, 2000). Na SDCR-I, a isquemia prolongada provoca o acúmulo de oxidases, que são enzimas que produzem radicais livres (CODERRE; BENNETT, 2010). Durante a

reperusão, o retorno de sangue oxigenado aumenta exponencialmente a produção de radicais livres (superóxido, radicais hidroxila, oxigênio singlete e o ânion peroxinitrito) que, por sua vez, lesionam as células endoteliais dos microvasos (por exemplo, dos capilares, arteríolas e vénulas) (INAUEN; SUZUKI; GRANGER, 1989; CODERRE; BENNETT, 2010). Além disso, este aumento de radicais livres estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) (INAUEN; SUZUKI; GRANGER, 1989), que se segue a partir da elevação dos níveis de expressão de NF $\kappa$ B (ASCER et al., 1992). Em suma, os níveis elevados de radicais livres de oxigênio, NF $\kappa$ B e citocinas pró-inflamatórias decorrentes do processo de isquemia prolongada seguida de rápida reperusão, resultam em disfunção microvascular e, de particular interesse para o presente estudo, levam à dor.

Os resultados aqui apresentados sugerem que um dos mecanismos responsáveis pela atividade analgésica/anti-inflamatória da LEDT neste modelo experimental, está associada a sua capacidade de diminuir importantes marcadores do estresse oxidativo (compostos carbonilados e equivalentes MDA) e restabelecer o sistema antioxidante enzimático (SOD e CAT) (Fig. 30), assim como por ter induzido aumento tecidual no local da IR da citocina anti-inflamatória IL-10 (Fig. 29), embora não tenha influenciado os níveis de citocinas pró-inflamatórias após IR da pata em camundongos.

Corroborando estas descobertas, alguns estudos têm demonstrado que a LEDT reduz os marcadores de estresse oxidativo em modelos animais de neuropatia (FITZGERALD et al., 2010; ISHIGURO; IKEDA; TOMITA, 2010) e diabetes crônica (LIM et al., 2009). Por outro lado, contrariamente aos resultados aqui obtidos, a LEDT diminuiu a expressão de mRNA de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , num modelo experimental de inflamação do tendão de Aquiles (XAVIER et al., 2010) bem como a expressão de TNF- $\alpha$  num modelo transecção do ligamento cruzado anterior em coelhos (OSHIMA et al., 2011). Variações no comprimento de onda e densidades de energia utilizadas nestes estudos podem ser responsáveis pela especificidade dos resultados. Estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos exatos responsáveis por esse efeito fotoestimulador seletivo.

Tomados em conjunto, os dados apresentados nesta série de experimentos, atestam sobre o efeito analgésico, anti-inflamatório e antioxidante da LEDT, uma vez que a terapia, mais especificamente, (1) reduziu significativamente os sinais comportamentais de

hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio, (2) estimulou o aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 e (3) induziu a diminuição dos níveis de marcadores de estresse oxidativo e do sistema antioxidante enzimático.

Estes resultados estendem os dados da literatura e, a partir de um ponto de vista translacional, apoiam uma investigação mais aprofundada sobre o uso de LEDT para o tratamento da SDCR-I e, por extensão, da algesia relacionada a quadros isquêmicos, condições inflamatórias, bem como a doenças que têm estresse oxidativo como um fator patogênico tais como a arteriosclerose, a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer e síndrome de fadiga crônica, dentre outras.

## 6.5 DURAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO DA LEDT

Como o efeito analgésico da LEDT foi de curta duração, ou seja, 30 minutos no modelo de ENI na dose de  $2,5 \text{ J/cm}^2$  e de até uma hora nos modelos de IP e IR na dose de  $9 \text{ J/cm}^2$ , pode-se argumentar que o tratamento não seja clinicamente relevante. Com relação a este ponto é importante notar que no presente estudo foi utilizado apenas um único diodo emissor de luz, a fim de se limitar o tratamento à área do ENI ou à superfície do aspecto plantar da pata traseira de um animal relativamente pequeno como o camundongo.

Na prática clínica, um painel constituinte de vários diodos em série pode ser utilizado, de fato há vários modelos comercialmente disponíveis, permitindo assim uma área de tratamento mais ampla. Além disso, como no caso da LEDT acupuntura (irradiação de pontos de acupuntura com a LEDT), uma série de aplicações pontuais é geralmente realizada em um mesmo paciente em uma mesma sessão com equipamentos adequados para esta modalidade de terapia, aumentando significativamente o tempo total de irradiação bem como a dose aplicada. No caso do estudo realizado por Costa e colaboradores (2007), por exemplo, no intuito de verificar o efeito analgésico da LEDT acupuntura no tratamento da dor crônica de diferentes etiologias vários acupontos foram utilizados na dose de  $7,5 \text{ J}$  por ponto, com uma média de 6 pontos por paciente, sendo neste caso a irradiação total aplicada de  $45 \text{ J}$  por paciente por sessão. Tal dose é consideravelmente superior às utilizadas no presente estudo e ao mesmo tempo, uma área maior de exposição foi obtida, especificamente seis vezes maior do que a aqui utilizada. Sugere-se que nestes casos, com dose total irradiada distribuída em diferentes pontos, um efeito mais duradouro poderia ser obtido. Estudos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese,

uma vez que não há literatura científica específica disponível sobre o assunto.

Além disso, devido a diferenças globais metabólicas e farmacocinéticas entre espécies, no caso específico entre murinos e seres humanos, “duração do efeito” pode variar consideravelmente. Por exemplo, em pacientes as doses orais de gabapentina são normalmente administradas três vezes por dia uma vez que sua meia-vida varia de 4,8 a 8,7 horas (ROSE; KAM, 2002). Entretanto, em modelos de dor neuropática em ratos, o efeito analgésico da gabapentina durou apenas cerca de duas horas no modelo de ligadura do nervo espinal (30 mg/kg, i.p.) (CIDRAL-FILHO et al., 2011) e no modelo de lesão do nervo poupado (30 mg/kg, s.c.) (FOLKESSON et al., 2010). Desnecessário mencionar que estudos adicionais são necessários para confirmar essas hipóteses.

## 7 CONCLUSÕES FINAIS

A terapia por diodo emissor de luz (*Light-Emitting Diode Therapy* - LEDT) apresentou efeito analgésico em diferentes modelos experimentais de nocicepção aguda e crônica.

No modelo de ENI a LEDT reduziu a hipersensibilidade mecânica, mas não acelerou a recuperação funcional motora nem a regeneração do nervo afetado pelo esmagamento;

No modelo de IP foi demonstrado que a atividade analgésica da LEDT envolve (1) a ativação de receptores opioides periféricos com, ao menos em parte, o recrutamento de leucócitos contendo opioides para o sítio da IP, (2) a ativação da via L-arginina/Óxido nítrico e, (3) a ativação tanto periférico quanto central de receptores adenosinérgicos A<sub>1</sub> e canabinoides CB<sub>1</sub>, bem como de CB<sub>2</sub> canabinoides em nível periférico;

No modelo de IR da pata a LEDT além de atividade analgésica demonstrou efeito anti-inflamatório e antioxidante, tendo reduzido significativamente a hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio, além de ter aumentado os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 e diminuído os níveis de marcadores de estresse oxidativo e do sistema antioxidante enzimático.

Finalmente, os resultados aqui apresentados atestam a favor da utilização da LEDT para o tratamento de quadros álgicos de diferentes etiologias, além de elucidar alguns dos mecanismos neurofisiológicos envolvidos neste efeito. Assim, devidamente fundamentada, a LEDT pode ser uma importante ferramenta complementar no tratamento da quadros álgicos, em especial por ser uma terapia segura, não invasiva, com poucos efeitos adversos e de baixo custo.

**REFERÊNCIAS**

- ABRAMOVITS, W.; ARRAZOLA, P.; GUPTA, A. K. Light-emitting diode-based therapy. **Skinmed.**, v. 4, n. 1, p. 38-41, 2005.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984.
- AGARWAL, N. et al. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 7, p. 870-9, Jul 2007.
- AKIL, H. et al. Endogenous opioids: overview and current issues. **Drug Alcohol Depend**, v. 51, n. 1-2, p. 127-40, Jun 1998.
- AL-HASANI, R.; BRUCHAS, M. R. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. **Anesthesiology**, v. 115, n. 6, p. 1363-81, Dec 2011.
- ALBRECHT, P. J. et al. Pathologic alterations of cutaneous innervation and vasculature in affected limbs from patients with complex regional pain syndrome. **Pain**, v. 120, n. 3, p. 244-66, Feb 2006.
- ALONZO, N. C.; BAYER, B. M. Opioids, immunology, and host defenses of intravenous drug abusers. **Infect Dis Clin North Am**, v. 16, n. 3, p. 553-69, Sep 2002.
- ANAND, P. et al. Targeting CB2 receptors and the endocannabinoid system for the treatment of pain. **Brain Res Rev**, v. 60, n. 1, p. 255-66, Apr 2009.
- APFELBAUM, J. L. et al. Postoperative pain experience: results from a national survey suggest postoperative pain continues to be undermanaged. **Anesth Analg**, v. 97, n. 2, p. 534-40, table of contents, Aug 2003.
- ARGOFF, C. Mechanisms of pain transmission and pharmacologic management. **Curr Med Res Opin**, v. 27, n. 10, p. 2019-31, Oct 2011.
- ASCER, E. et al. Do cytokines play a role in skeletal muscle ischemia and reperfusion? **J Cardiovasc Surg (Torino)**, v. 33, n. 5, p. 588-92, Sep-Oct 1992.



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

BALLANTYNE, J. C. et al. The comparative effects of postoperative analgesic therapies on pulmonary outcome: cumulative meta-analyses of randomized, controlled trials. **Anesth Analg**, v. 86, n. 3, p. 598-612, Mar 1998.

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

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

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

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, Oct 16 2009.

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

BASTOS, J. L. N.; LIZARELLI, R. F. Z.; PARIZOTTO, N. A. Comparative Study of Laser and LED Systems of Low Intensity Applied to Tendon Healing. **Laser Physics**, v. Vol. 19, n. No. 9, p. 1925–1931, 2009.

BAXTER, D. Laserterapia de baixa intensidade. In: KITCHEN, S. (Ed.). **Eletroterapia: prática baseada em evidências**. 11. São Paulo: Manole, 2003.

BAXTER, G. A., **J. Therapeutic lasers: Theory and practice**. London: Churchill Livingstone, 1995.

BENDER, T. et al. The effect of physical therapy on beta-endorphin levels. **Eur J Appl Physiol**, v. 100, n. 4, p. 371-82, Jul 2007.

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

BERTOLINI, G. R. et al. Low-level laser therapy, at 830 nm, for pain reduction in experimental model of rats with sciatica. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 69, n. 2B, p. 356-9, 2011.

BIAN, X. P.; YU, Z. Q.; LIU, D. M. The experiment studies of semiconductor GaAs-laser points irradiation the analgesic effect. **Zhen Ci Yan Jiu**, v. 14, n. 3, p. 379-82, 1989.

BJORDAL, J. M.; COUPPÅ, C.; LJUNGGREN, E. Low level laser therapy for tendinopathy. Evidence of a dose-response pattern. **Physical Therapy Reviews**, v. 6, p. 91-99, 2001.

BLAKE, D. J.; KROGER, S. The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? **Trends Neurosci**, v. 23, n. 3, p. 92-9, Mar 2000.

BOCCABELLA, A. V. et al. Influence of Hormones on Recovery of Electrical Activity of Crushed Sciatic Nerves in Hypophysectomized Rats. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 117, p. 800-3, Dec 1964.

BORSOOK, D. A Future Without Chronic Pain: Neuroscience and Clinical Research. **Cerebrum**, v. on line, 2012.

BOUHASSIRA, D. et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. **Pain**, v. 136, n. 3, p. 380-7, Jun 2008.

BRACK, A. et al. Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. **Pain**, v. 112, n. 3, p. 229-38, Dec 2004.

BRASIL. Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.

BRATTI, T. Caracterização comportamental, bioquímica e farmacológica e efeito da natação sobre o modelo experimental da síndrome da dor complexa regional tipo I em camundongos. 2011. (Mestrado em Neurociências). Centro de Ciências Biológicas, Programa

de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BRENNAN, T. J.; VANDERMEULEN, E. P.; GEBHART, G. F. Characterization of a rat model of incisional pain. **Pain**, v. 64, n. 3, p. 493-501, Mar 1996.

BRENNAN, T. J.; ZAHN, P. K.; POGATZKI-ZAHN, E. M. Mechanisms of incisional pain. **Anesthesiol Clin North America**, v. 23, n. 1, p. 1-20, Mar 2005.

BRIDGE, P. M. et al. Nerve crush injuries - a model for axonotmesis. **Exp Neurol**, v. 127, n. 2, p. 284-90, Jun 1994.

BRUEHL, S. et al. What do plasma beta-endorphin levels reveal about endogenous opioid analgesic function? **Eur J Pain**, v. 16, n. 3, p. 370-80, Mar 2012.

BURNSTOCK, G. Purinergic receptors and pain. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 15, p. 1717-35, 2009.

CALIGNANO, A.; LA RANA, G.; PIOMELLI, D. Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide. **Eur J Pharmacol**, v. 419, n. 2-3, p. 191-8, May 11 2001.

CAMARGO, M. Z. et al. Effects of light emitting diode (LED) therapy and cold water immersion therapy on exercise-induced muscle damage in rats. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 5, p. 1051-8, Sep 2012.

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

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

CERUTTI, P. A. Response modification in carcinogenesis. **Environ Health Perspect**. p. 39-43, 1989.

CHANG, P. C. et al. Irradiation by light-emitting diode light as an adjunct to facilitate healing of experimental periodontitis in vivo. **J**

**Periodontal Res**, Jul 29 2012.

CHAORAN WU, J. X., SINYOUNG KANG, CHRISTINA M. SPOFFORD, AND TIMOTHY J. BRENNAN. Animal Models of Postoperative Pain. In: ZHANG, C. M. J.-M. (Ed.). Animal models of pain. London: Humana Press, 2011.

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

CHEN, Y. et al. Nitric oxide synthase modulates CFA-induced thermal hyperalgesia through cytokine regulation in mice. **Mol Pain**, v. 6, p. 13, 2010.

CHOI, H. et al. Inflammatory cytokines are suppressed by light-emitting diode irradiation of *P. gingivalis* LPS-treated human gingival fibroblasts: inflammatory cytokine changes by LED irradiation. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 2, p. 459-67, Mar 2012.

CICHEWICZ, D. L. Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. **Life Sci**, v. 74, n. 11, p. 1317-24, Jan 30 2004.

CIDRAL-FILHO, F. J. et al. Manual acupuncture inhibits mechanical hypersensitivity induced by spinal nerve ligation in rats. **Neuroscience**, v. 193, p. 370-6, Oct 13 2011.

CODERRE, T. J.; BENNETT, G. J. Objectifying CRPS-I. **Pain**, v. 138, n. 1, p. 3-4, Aug 15 2008.

CODERRE, T. J.; BENNETT, G. J. A hypothesis for the cause of complex regional pain syndrome-type I (reflex sympathetic dystrophy): pain due to deep-tissue microvascular pathology. **Pain Med**, v. 11, n. 8, p. 1224-38, Aug 2010.

CODERRE, T. J. et al. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. **Pain**, v. 112, n. 1-2, p. 94-105, Nov 2004.

COSTA, J. M.; CORRAL-BAQUES, M. I.; AMAT, A. Acupuncture: A first approach on pain relief using a 617 nm led device. Proc. of SPIE

Vol. 6428, 2007.

COSTA, J. M. et al. Tratamiento de 15 casos de dolor crónico con un equipo de fotopuntura por diodos emisores de luz roja (617 nm).

**Revista Internacional de Acupuntura**, v. 2, n. 1, p. 63-66, Jan/Mar, 2008.

COSTANTINO, C. M. et al. Opioid receptor heteromers in analgesia.

**Expert Rev Mol Med**, v. 14, p. e9, 2012.

COUSINS, M. J.; POWER, I.; SMITH, G. 1996 Labat lecture: pain-a

persistent problem. **Reg Anesth Pain Med**, v. 25, n. 1, p. 6-21, Jan-Feb 2000.

CURY, Y. et al. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 3, p. 243-54, Oct 30 2011.

DE MOS, M. et al. The incidence of complex regional pain syndrome: a population-based study. **Pain**, v. 129, n. 1-2, p. 12-20, May 2007.

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

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

DHAWAN, B. N. et al. International Union of Pharmacology. XII.

Classification of opioid receptors. **Pharmacol Rev**, v. 48, n. 4, p. 567-92, Dec 1996.

DI MARZO, V. The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential

therapeutic exploitation. **Pharmacol Res**, v. 60, n. 2, p. 77-84, Aug 2009.

DIJKSTRA, J. R. et al. Methods to evaluate functional nerve recovery in

adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. **J Neurosci Methods**, v. 96, n. 2, p. 89-96, Mar 15 2000.

DIXON, A. K. et al. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. **Br J Pharmacol**, v. 118, n. 6, p. 1461-8, Jul 1996.

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

DOGRUL, A. et al. 'Knock-down' of spinal CB1 receptors produces abnormal pain and elevates spinal dynorphin content in mice. **Pain**, v. 100, n. 1-2, p. 203-9, Nov 2002.

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

EELLS, J. T. et al. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. **Mitochondrion**, v. 4, n. 5-6, p. 559-67, Sep 2004.

EISENBERG, E. et al. Serum and salivary oxidative analysis in Complex Regional Pain Syndrome. **Pain**, v. 138, n. 1, p. 226-32, Aug 15 2008.

ENGLAND, J. D.; ASBURY, A. K. Peripheral neuropathy. **Lancet**, v. 363, n. 9427, p. 2151-61, Jun 26 2004.

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

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

ESPLUGUES, J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system. **Br J Pharmacol**, v. 135, n. 5, p. 1079-95, Mar 2002.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 407-21, 1990.

FELIU, M. H.; EDWARDS, C. L. Psychologic factors in the development of complex regional pain syndrome: history, myth, and

evidence. **Clin J Pain**, v. 26, n. 3, p. 258-63, Mar-Apr 2010.

FENG, Y. et al. Current research on opioid receptor function. **Curr Drug Targets**, v. 13, n. 2, p. 230-46, Feb 2012.

FERRARI, R. et al. Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. **Am J Clin Nutr**, v. 53, n. 1 Suppl, p. 215S-222S, Jan 1991.

FERREIRA, D. M. et al. Analgesic effect of He-Ne (632.8 nm) low-level laser therapy on acute inflammatory pain. **Photomed Laser Surg**, v. 23, n. 2, p. 177-81, Apr 2005.

FIELDS, H. State-dependent opioid control of pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 7, p. 565-75, Jul 2004.

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

FIORIO, F. B. et al. Effect of incoherent LED radiation on third-degree burning wounds in rats. **J Cosmet Laser Ther**, v. 13, n. 6, p. 315-22, Dec 2011.

FITZGERALD, M. et al. Near infrared light reduces oxidative stress and preserves function in CNS tissue vulnerable to secondary degeneration following partial transection of the optic nerve. **J Neurotrauma**, v. 27, n. 11, p. 2107-19, Nov 2010.

FOLKESSON, A. et al. Low dose of donepezil improves gabapentin analgesia in the rat spared nerve injury model of neuropathic pain: single and multiple dosing studies. **J Neural Transm**, v. 117, n. 12, p. 1377-85, Dec 2010.

FONSECA, P. D. et al. Effects of light emitting diode (LED) therapy at 940 nm on inflammatory root resorption in rats. **Lasers Med Sci**, v. 28, n. 1, p. 49-55, Jan 2013.

FOX, A.; BEVAN, S. Therapeutic potential of cannabinoid receptor agonists as analgesic agents. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 14, n. 6, p. 695-703, Jun 2005.

FOX, C. D.; BERGER, D.; FINE, P. G. Pain assessment and treatment in the managed care environment. . In: (Ed.). A position statement from the American Pain Society. Glenview: **American Pain Society**, 2000.

GAO, Z. G. et al. Allosteric modulation of the adenosine family of receptors. **Mini Rev Med Chem**, v. 5, n. 6, p. 545-53, Jun 2005.

GEBHART, G. F. Descending modulation of pain. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 27, n. 8, p. 729-37, Jan 2004.

GIULIANI, A. et al. Very low level laser therapy attenuates edema and pain in experimental models. **Int J Tissue React**, v. 26, n. 1-2, p. 29-37, 2004.

GOLDBERG, D.; RUSSELL, B. Combination blue (415 nm) and red (633 nm) LED phototherapy in the treatment of mild to severe acne vulgaris. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 8, n. 2, p. 71-75, 2006.

GOLDMAN, N. et al. Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 883-8, Jul 2010.

GOMES, L. E.; DALMARCO, E. M.; ANDRE, E. S. The brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, neurotrophin-3, and induced nitric oxide synthase expressions after low-level laser therapy in an axonotmesis experimental model. **Photomed Laser Surg**, v. 30, n. 11, p. 642-7, Nov 2012.

GRECO, M. et al. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 163, n. 3, p. 1428-34, Sep 29 1989.

GROENEWEG, J. G. et al. Increased endothelin-1 and diminished nitric oxide levels in blister fluids of patients with intermediate cold type complex regional pain syndrome type 1. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 7, p. 91, 2006.

GROTENHERMEN, F.; MULLER-VAHL, K. The therapeutic potential of cannabis and cannabinoids. **Dtsch Arztebl Int**, v. 109, n. 29-30, p. 495-501, Jul 2012.



GU, X. et al. Intrathecal administration of the cannabinoid 2 receptor agonist JWH015 can attenuate cancer pain and decrease mRNA expression of the 2B subunit of N-methyl-D-aspartic acid. **Anesth Analg**, v. 113, n. 2, p. 405-11, Aug 2011.

GUIMARÃES, M. Z. P.; JORDT, S. E. TRPA1: A Sensory Channel of Many Talents. LIEDTKE, W.B.; HELLER S. (ed.). TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007.

GUNDUZ, O.; KARADAG, H. C.; ULUGOL, A. Synergistic anti-allodynic effects of nociceptin/orphanin FQ and cannabinoid systems in neuropathic mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 99, n. 4, p. 540-4, Oct 2011.

HAGIWARA, S. et al. Pre-Irradiation of blood by gallium aluminum arsenide (830 nm) low-level laser enhances peripheral endogenous opioid analgesia in rats. **Anesth Analg**, v. 107, n. 3, p. 1058-63, Sep 2008.

HAGIWARA, S. et al. GaAlAs (830 nm) low-level laser enhances peripheral endogenous opioid analgesia in rats. **Lasers Surg Med**, v. 39, n. 10, p. 797-802, Dec 2007.

HAJOS, N.; LEDENT, C.; FREUND, T. F. Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. **Neuroscience**, v. 106, n. 1, p. 1-4, 2001.

HASHMI, J. T. et al. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. **PMR**, v. 2, n. 12 Suppl 2, p. S292-305, Dec 2010.

HEJAZI, N. et al. Delta9-tetrahydrocannabinol and endogenous cannabinoid anandamide directly potentiate the function of glycine receptors. **Mol Pharmacol**, v. 69, n. 3, p. 991-7, Mar 2006.

HIRST, D. G.; ROBSON, T. Nitric oxide physiology and pathology. **Methods Mol Biol**, v. 704, p. 1-13, 2011.

HODGSON, B. D. et al. Amelioration of oral mucositis pain by NASA near-infrared light-emitting diodes in bone marrow transplant patients.

**Support Care Cancer**, v. 20, n. 7, p. 1405-15, Jul 2012.

HOHMANN, A. G.; SUPLITA, R. L., 2ND. Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. **AAPS J**, v. 8, n. 4, p. E693-708, 2006.

HONMURA, A. et al. Analgesic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. **Lasers Surg Med**, v. 13, n. 4, p. 463-9, 1993.

HSIEH, Y. L. et al. Low-level laser therapy alleviates neuropathic pain and promotes function recovery in rats with chronic constriction injury: Possible involvements in hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha). **J Comp Neurol**, v. 520, n. 13, p. 2903-16, Sep 1 2012.

HU, W. P. et al. Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. **J Invest Dermatol**, v. 127, n. 8, p. 2048-57, Aug 2007.

HUANG, C. et al. Attenuation of mechanical but not thermal hyperalgesia by electroacupuncture with the involvement of opioids in rat model of chronic inflammatory pain. **Brain Res Bull**, v. 63, n. 2, p. 99-103, Mar 15 2004.

HUANG, D. et al. Effects of linear-polarized near-infrared light irradiation on chronic pain. **ScientificWorld Journal**, v. 2012, p. 567496, 2012.

HUANG, T. H.; LU, Y. C.; KAO, C. T. Low-level diode laser therapy reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced bone cell inflammation. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 3, p. 621-7, May 2012.

HURLEY, R. W.; HAMMOND, D. L. The analgesic effects of supraspinal mu and delta opioid receptor agonists are potentiated during persistent inflammation. **J Neurosci**, v. 20, n. 3, p. 1249-59, Feb 1 2000.

HUYGEN, F. J. et al. Evidence for local inflammation in complex regional pain syndrome type 1. **Mediators Inflamm**, v. 11, n. 1, p. 47-51, Feb 2002.

HUYGEN, F. J. et al. Mast cells are involved in inflammatory reactions during Complex Regional Pain Syndrome type 1. **Immunol Lett**, v. 91,

n. 2-3, p. 147-54, Feb 15 2004.

HYLDEN, J. L.; WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur J Pharmacol**, v. 67, n. 2-3, p. 313-6, Oct 17 1980.

IBRAHIM, M. M. et al. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, n. 8, p. 3093-8, Feb 22 2005.

INAUEN, W.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Mechanisms of cellular injury: potential sources of oxygen free radicals in ischemia/reperfusion. **Microcirc Endothelium Lymphatics**, v. 5, n. 3-5, p. 143-55, Jun-Oct 1989.

INSERRA, M. M.; BLOCH, D. A.; TERRIS, D. J. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. **Microsurgery**, v. 18, n. 2, p. 119-24, 1998.

INSTITUTE OF MEDICINE COMMITTEE ON ADVANCING PAIN RESEARCH AND EDUCATION. Education, and Research 2011. Disponível em: < <http://www.IMCAPRE.org> >. Acesso em: março de 2013.

IRVING, G. A. Contemporary assessment and management of neuropathic pain. **Neurology**, v. 64, n. 12 Suppl 3, p. S21-7, Jun 28 2005.

ISHIGURO, M.; IKEDA, K.; TOMITA, K. Effect of near-infrared light-emitting diodes on nerve regeneration. **J Orthop Sci**, v. 15, n. 2, p. 233-9, Mar 2010.

JACKSON, R. F.; ROCHE, G.; MANGIONE, T. Low-Level Laser Therapy Effectiveness for Reducing Pain After Breast Augmentation. **The American Journal of Cosmetic Surgery**, v. 26, n. 3, 2009.

JACOBSON, K. A.; GAO, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 3, p. 247-64, Mar 2006.

JAMES, A. M. et al. Mitochondrial oxidative stress and the metabolic syndrome. **Trends Endocrinol Metab**, v. 23, n. 9, p. 429-34, Sep 2012.

JOHNSON, J. R. et al. An Open-Label Extension Study to Investigate the Long-Term Safety and Tolerability of THC/CBD Oromucosal Spray and Oromucosal THC Spray in Patients With Terminal Cancer-Related Pain Refractory to Strong Opioid Analgesics. **J Pain Symptom Manage**, Nov 7 2012.

JONSSON, K. O. et al. Effects of homologues and analogues of palmitoylethanolamide upon the inactivation of the endocannabinoid anandamide. **Br J Pharmacol**, v. 133, n. 8, p. 1263-75, Aug 2001.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, Sep 13 2001.

KAPITZKE, D.; VETTER, I.; CABOT, P. J. Endogenous opioid analgesia in peripheral tissues and the clinical implications for pain control. **Ther Clin Risk Manag**, v. 1, n. 4, p. 279-97, Dec 2005.

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

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

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

KARU, T. I. Cellular mechanisms of low-power laser therapy. In: MUELLER, G.; TUCHIN, V. V., et al, Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering, 2002, Moscow. p.60-66.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; AFANASYEVA, N. I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Lasers Surg Med**, v. 36, n. 4, p. 307-14, Apr 2005.

KELLEY, N. E.; TEPPER, D. E. Rescue therapy for acute migraine, part 3: opioids, NSAIDs, steroids, and post-discharge medications. **Headache**, v. 52, n. 3, p. 467-82, Mar 2012.

KHADRA, M. The effect of low level laser irradiation on implant-tissue interaction. In vivo and in vitro studies. **Swed Dent J Suppl**, n. 172, p.

1-63, 2005.

KHASABOVA, I. A. et al. Increasing 2-arachidonoyl glycerol signaling in the periphery attenuates mechanical hyperalgesia in a model of bone cancer pain. **Pharmacol Res**, v. 64, n. 1, p. 60-7, Jul 2011.

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

KIM, E. H. et al. Analgesic effects by electroacupuncture were decreased in inducible nitric oxide synthase knockout mice. **Neurol Res**, v. 29 Suppl 1, p. S28-31, 2007.

KIM, H. I. et al. Anandamide suppression of Na<sup>+</sup> currents in rat dorsal root ganglion neurons. **Brain Res**, v. 1062, n. 1-2, p. 39-47, Nov 16 2005.

KIM, J. Y.; SHIN, J. H.; LEE, S. S. Cardioprotective effects of diet with different grains on lipid profiles and antioxidative system in obesity-induced rats. **Int J Vitam Nutr Res**, v. 82, n. 2, p. 85-93, Apr 2012.

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

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

KOBAN, M. et al. Tissue hypoxia in complex regional pain syndrome. **Pain**, v. 104, n. 1-2, p. 149-57, Jul 2003.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol Pathol**, v. 30, n. 6, p. 620-50, Nov-Dec 2002.

KOKEL, D. et al. Photochemical activation of TRPA1 channels in neurons and animals. **Nat Chem Biol**, v. 9, n. 4, p. 257-63, Apr 2013.

KOLAROVA, H.; DITRICOVA, D.; WAGNER, J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. **Lasers Surg Med**, v. 24, n. 3, p. 231-5,

1999.

KONTINEN, V. K.; MEERT, T. F. Vocalization responses after spinal administration of bicuculline or strychnine in rats. **Neuromodulation**, v. 5, n. 4, p. 221-30, Oct 2002.

KRAMER, H. H. et al. TNF-alpha in CRPS and 'normal' trauma - significant differences between tissue and serum. **Pain**, v. 152, n. 2, p. 285-90, Feb 2011.

KREISLER, M. B. et al. Efficacy of low level laser therapy in reducing postoperative pain after endodontic surgery - a randomized double blind clinical study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 33, n. 1, p. 38-41, Jan 2004.

KWON, H. et al. Effect of 635 nm irradiation on high glucose-boosted inflammatory responses in LPS-induced MC3T3-E1 cells. **Lasers Med Sci**, Jun 15 2012.

KWON, H. H. et al. The clinical and histological effect of home-use, combination blue-red LED phototherapy for mild to moderate acne vulgaris in Korean patients: a double blind, randomized controlled trial. **Br J Dermatol**, Dec 19 2012.

LA RANA, G. et al. AM404, an anandamide transport inhibitor, reduces plasma extravasation in a model of neuropathic pain in rat: role for cannabinoid receptors. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 3, p. 521-9, Mar 2008.

LAFERRIERE, A. et al. Cutaneous tactile allodynia associated with microvascular dysfunction in muscle. **Mol Pain**, v. 4, p. 49, 2008.

LARGENT-MILNES, T. M. et al. Oxycodone plus ultra-low-dose naltrexone attenuates neuropathic pain and associated mu-opioid receptor-Gs coupling. **J Pain**, v. 9, n. 8, p. 700-13, Aug 2008.

LEE, S. Y.; YOU, C. E.; PARK, M. Y. Blue and red light combination LED phototherapy for acne vulgaris in patients with skin phototype IV. **Lasers Surg Med**, v. 39, n. 2, p. 180-8, Feb 2007.

LESNIAK, A.; LIPKOWSKI, A. W. Opioid peptides in peripheral pain

control. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 71, n. 1, p. 129-38, 2011.

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

LEVINE, R. L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 346-57, 1994.

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

LIM, J. et al. Effects of low-level light therapy on hepatic antioxidant defense in acute and chronic diabetic rats. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 23, n. 1, p. 1-8, Jan-Feb 2009.

LIM, W. et al. The anti-inflammatory mechanism of 635 nm light-emitting-diode irradiation compared with existing COX inhibitors. **Lasers Surg Med**, v. 39, n. 7, p. 614-21, Aug 2007.

LIMANSKY, Y. P.; TAMAROVA, Z. A.; GULYAR, S. A. Suppression of pain by exposure of acupuncture points to polarized light. **Pain Res Manag**, v. 11, n. 1, p. 49-57, Spring 2006.

LIZARELLI, R. F. Z. et al. Dentin hypersensitivity clinical study comparing LILT and LEDT keeping the same irradiation parameters. **Laser Physics Letters**, v. 7, n. 11, p. 805-811, 2010.

LO, Y. J. et al. Interleukin 1beta-secreting cells in inflamed gingival tissue of adult periodontitis patients. **Cytokine**, v. 11, n. 8, p. 626-33, Aug 1999.

LOBKO, V. V.; KARU, T. I.; LETOKHOV, V. S. Is the coherence of low-intensity laser light essential for its effect on biological objects? **Biofizika**, v. 30, n. 2, p. 366-71, Mar-Apr 1985.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, Jul 31 2008.

LOMBARD, M. C. et al. Deafferentation hypersensitivity in the rat after

dorsal rhizotomy: a possible animal model of chronic pain. **Pain**, v. 6, n. 2, p. 163-74, Apr 1979.

LORENZINI, L. et al. Laser acupuncture for acute inflammatory, visceral and neuropathic pain relief: An experimental study in the laboratory rat. **Res Vet Sci**, v. 88, n. 1, p. 159-65, Feb 2010.

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

LUO, Z. D.; CIZKOVA, D. The role of nitric oxide in nociception. **Curr Rev Pain**, v. 4, n. 6, p. 459-66, 2000.

MACHELSKA, H. Targeting of opioid-producing leukocytes for pain control. **Neuropeptides**, v. 41, n. 6, p. 355-63, Dec 2007.

MANFREDI, M. et al. Congenital absence of pain. **Arch Neurol**, v. 38, n. 8, p. 507-11, Aug 1981.

MARINUS, J. et al. Clinical features and pathophysiology of complex regional pain syndrome. **Lancet Neurol**, v. 10, n. 7, p. 637-48, Jul 2011.

MARTINS, D. F. et al. Ankle joint mobilization decreases hypersensitivity by activation of peripheral opioid receptors in a mouse model of postoperative pain. **Pain Med**, v. 13, n. 8, p. 1049-58, Aug 2012.

MARTINS, D. F. et al. Ankle Joint Mobilization Affects Postoperative Pain Through Peripheral and Central Adenosine A1 Receptors. **Phys Ther**, Jan 10 2013.

MCCORD, J. M. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. **Fed Proc**, v. 46, n. 7, p. 2402-6, May 15 1987.

MEINHARDT, M. et al. Wavelength-dependent penetration depths of ultraviolet radiation in human skin. **J Biomed Opt**, v. 13, n. 4, p. 044030, Jul-Aug 2008.

MELIS, M.; DI GIOSIA, M.; ZAWAWI, K. H. Low level laser therapy for the treatment of temporomandibular disorders: a systematic review of the literature. **Cranio**, v. 30, n. 4, p. 304-12, Oct 2012.



MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, n. 3699, p. 971-9, Nov 19 1965.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg Med**, v. 5, n. 1, p. 31-9, 1985.

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

MICLESCU, A.; GORDH, T. Nitric oxide and pain: 'Something old, something new'. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 53, n. 9, p. 1107-20, Oct 2009.

MILLECAMPS, M. et al. Role of peripheral endothelin receptors in an animal model of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS-I). **Pain**, v. 151, n. 1, p. 174-83, Oct 2010.

MITCHINSON, A. R. et al. Acute postoperative pain management using massage as an adjuvant therapy: a randomized trial. **Arch Surg**, v. 142, n. 12, p. 1158-67; discussion 1167, Dec 2007.

MIZGERD, J. P.; SPIEKER, M. R.; DOERSCHUK, C. M. Early response cytokines and innate immunity: essential roles for TNF receptor 1 and type I IL-1 receptor during Escherichia coli pneumonia in mice. **J Immunol**, v. 166, n. 6, p. 4042-8, Mar 15 2001.

MIZOGUCHI, H. et al. New vistas in opioid control of pain. **Curr Opin Pharmacol**, v. 12, n. 1, p. 87-91, Feb 2012.

MONTES-MOLINA, R. et al. Interferential light therapy in the treatment of shoulder tendinopathies: a randomized controlled pilot study. **Clin Rehabil**, v. 26, n. 12, p. 1114-22, Dec 2012.

MORI, M. et al. Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. **J Physiol**, v. 535, n. Pt 1, p. 115-23, Aug 15 2001.

MORIYAMA, Y. et al. In vivo study of the inflammatory modulating effects of low-level laser therapy on iNOS expression using bioluminescence imaging. **Photochem Photobiol**, v. 81, n. 6, p. 1351-5,

Nov-Dec 2005.

MORIYAMA, Y. et al. In vivo effects of low level laser therapy on inducible nitric oxide synthase. **Lasers Surg Med**, v. 41, n. 3, p. 227-31, Mar 2009.

MOUSA, S. A. et al. Immunohistochemical localization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in immune cells and spinal cord in a model of inflammatory pain. **J Neuroimmunol**, v. 126, n. 1-2, p. 5-15, May 2002.

MOUSA, S. A. et al. Subcellular pathways of beta-endorphin synthesis, processing, and release from immunocytes in inflammatory pain. **Endocrinology**, v. 145, n. 3, p. 1331-41, Mar 2004.

NEZIRI, A. Y. et al. Factor analysis of responses to thermal, electrical, and mechanical painful stimuli supports the importance of multi-modal pain assessment. **Pain**, v. 152, n. 5, p. 1146-55, May 2011.

NIEDERBERGER, E.; KUHLEIN, H.; GEISLINGER, G. Update on the pathobiology of neuropathic pain. **Expert Rev Proteomics**, v. 5, n. 6, p. 799-818, Dec 2008.

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

NUSSBAUM, E. L. B., D; LILGE, L. A review of laser technology and light-tissue interactions as a background to therapeutic applications of low intensity lasers and other light sources. **Phys Ther Rev**, v. 8, n. 1, p. 31-44, 2003.

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

OLIVEIRA, S. M. et al. Involvement of mast cells in a mouse model of postoperative pain. **Eur J Pharmacol**, v. 672, n. 1-3, p. 88-95, Dec 15 2011.

OLSON, N.; VAN DER VLIET, A. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory

disease. *Nitric Oxide*, v. 25, n. 2, p. 125-37, Aug 1 2011.

OPREE, A.; KRESS, M. Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *J Neurosci*, v. 20, n. 16, p. 6289-93, Aug 15 2000.

OSHIMA, Y. et al. Effect of light-emitting diode (LED) therapy on the development of osteoarthritis (OA) in a rabbit model. **Biomed Pharmacother**, v. 65, n. 3, p. 224-9, Jun 2011.

OZ, M. Receptor-independent actions of cannabinoids on cell membranes: focus on endocannabinoids. **Pharmacol Ther**, v. 111, n. 1, p. 114-44, Jul 2006.

PACHER, P.; BATKAI, S.; KUNOS, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 3, p. 389-462, Sep 2006.

PASSARELLA, S. et al. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **FEBS Lett**, v. 175, n. 1, p. 95-9, Sep 17 1984.

PASTORE, D. et al. Stimulation of ATP synthesis via oxidative phosphorylation in wheat mitochondria irradiated with helium-neon laser. **Biochem Mol Biol Int**, v. 39, n. 1, p. 149-57, May 1996.

PERES E SERRA, A.; ASHMAWI, H. A. Influence of naloxone and methysergide on the analgesic effects of low-level laser in an experimental pain model. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 60, n. 3, p. 302-10, May-Jun 2010.

PIOMELLI, D. The endocannabinoid system: a drug discovery perspective. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 6, n. 7, p. 672-9, Jul 2005.

PITCHER, G. M.; HENRY, J. L. Nociceptive response to innocuous mechanical stimulation is mediated via myelinated afferents and NK-1 receptor activation in a rat model of neuropathic pain. **Exp Neurol**, v. 186, n. 2, p. 173-97, Apr 2004.

POGATZKI, E. M.; RAJA, S. N. A mouse model of incisional pain. **Anesthesiology**, v. 99, n. 4, p. 1023-7, Oct 2003.

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

QUAH-SMITH, I. et al. The brain effects of laser acupuncture in healthy individuals: an fMRI investigation. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12619, 2010.

QUAH-SMITH, J. I.; TANG, W. M.; RUSSELL, J. Laser acupuncture for mild to moderate depression in a primary care setting--a randomised controlled trial. **Acupunct Med**, v. 23, n. 3, p. 103-11, Sep 2005.

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

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A. M.; DE MENDONÇA, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. **Prog Neurobiol**, v. 68, n. 6, p. 377-92, Dec 2002.

RICHMOND, C. E.; BROMLEY, L. M.; WOOLF, C. J. Preoperative morphine pre-empted postoperative pain. **Lancet**, v. 342, n. 8863, p. 73-5, Jul 10 1993.

RIMULO, A. L. et al. Chemotherapy-induced oral mucositis in a patient with acute lymphoblastic leukaemia. **Eur Arch Paediatr Dent**, v. 12, n. 2, p. 124-7, Apr 2011.

RITTNER, H. L.; MACHELSKA, H.; STEIN, C. Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. **J Leukoc Biol**, v. 78, n. 6, p. 1215-22, Dec 2005.

ROBINSON, J. N.; SANDOM, J.; CHAPMAN, P. T. Efficacy of pamidronate in complex regional pain syndrome type I. **Pain Med**, v. 5, n. 3, p. 276-80, Sep 2004.

ROELANDTS, R. The history of phototherapy: something new under

the sun? **J Am Acad Dermatol**, v. 46, n. 6, p. 926-30, Jun 2002.

ROSE, M. A.; KAM, P. C. Gabapentin: pharmacology and its use in pain management. **Anaesthesia**, v. 57, n. 5, p. 451-62, May 2002.

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

SABER, K.; CHINIFORUSH, N.; SHAHABI, S. The effect of low level laser therapy on pain reduction after third molar surgery. **Minerva Stomatol**, v. 61, n. 7-8, p. 319-22, Jul-Aug 2012.

SACONO, N. T. et al. Light-emitting diode therapy in chemotherapy-induced mucositis. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 40, n. 9, p. 625-633, 2008.

SANDKUHLER, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. **Physiol Rev**, v. 89, n. 2, p. 707-58, Apr 2009.

SANDNER-KIESLING, A.; LI, X.; EISENACH, J. C. Morphine-induced spinal release of adenosine is reduced in neuropathic rats. **Anesthesiology**, v. 95, n. 6, p. 1455-9, Dec 2001.

SANTOS, A. R. et al. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 289, n. 1, p. 417-26, Apr 1999.

SAWYNOK, J.; LIU, X. J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. **Prog Neurobiol**, v. 69, n. 5, p. 313-40, Apr 2003.

SBED. Conheça mais sobre a dor. 2013. Disponível em: <<http://www.dor.org.br/publico/impactos.asp>>. Acesso em: março de 2013.

SCHAFFER, M.; CARTER, L.; STEIN, C. Interleukin 1 beta and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 10, p. 4219-23, May 10 1994.

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

SCHMIDTKO, A.; TEGEDER, I.; GEISLINGER, G. No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 6, p. 339-46, Jun 2009.

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

SEBASTIÃO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Adenosine receptors and the central nervous system. **Handb Exp Pharmacol**, n. 193, p. 471-534, 2009.

SEBASTIÃO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Tuning and fine-tuning of synapses with adenosine. **Curr Neuropharmacol**, v. 7, n. 3, p. 180-94, Sep 2009.

SEBASTIN, S. J. Complex regional pain syndrome. **Indian J Plast Surg**, v. 44, n. 2, p. 298-307, May 2011.

SEIFERT, F. et al. Differential endogenous pain modulation in complex-regional pain syndrome. **Brain**, v. 132, n. Pt 3, p. 788-800, Mar 2009.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, n. 2, p. 205-18, Nov 1990.

SERAFIM, K. G. et al. Effects of 940 nm light-emitting diode (led) on sciatic nerve regeneration in rats. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 1, p. 113-9, Jan 2012.

SHARMA, S. K. et al. Dose response effects of 810 nm laser light on mouse primary cortical neurons. **Lasers Surg Med**, v. 43, n. 8, p. 851-9, Sep 2011.

SHOOSHTARI, S. M. et al. The effects of low level laser in clinical outcome and neurophysiological results of carpal tunnel syndrome. **Electromyogr Clin Neurophysiol**, v. 48, n. 5, p. 229-31, Jun-Jul 2008.

SIEDENTOPF, C. M. et al. Functional magnetic resonance imaging detects activation of the visual association cortex during laser acupuncture of the foot in humans. **Neurosci Lett**, v. 327, n. 1, p. 53-6, Jul 12 2002.

SIEDENTOPF, C. M. et al. Laser acupuncture induced specific cerebral cortical and subcortical activations in humans. **Lasers Med Sci**, v. 20, n. 2, p. 68-73, Sep 2005.

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

SLATER, T. F. Free-radical mechanisms in tissue injury. **Biochem J**, v. 222, n. 1, p. 1-15, Aug 15 1984.

SMITH, S. B.; CRAGER, S. E.; MOGIL, J. S. Paclitaxel-induced neuropathic hypersensitivity in mice: responses in 10 inbred mouse strains. **Life Sci**, v. 74, n. 21, p. 2593-604, Apr 9 2004.

SOMMER, C.; SCHAFERS, M. Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. **Brain Res**, v. 784, n. 1-2, p. 154-62, Feb 16 1998.

SONG, S. et al. Low-level laser therapy regulates microglial function through Src-mediated signaling pathways: implications for neurodegenerative diseases. **J Neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 219, Sep 18 2012.

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

SPIGELMAN, I. Therapeutic Targeting of Peripheral Cannabinoid Receptors in Inflammatory and Neuropathic Pain States. In: KRUGER L., LIGHT A.R. (ed.). *Translational Pain Research: From Mouse to Man*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2010.

STANTON-HICKS, M. et al. Reflex sympathetic dystrophy: changing concepts and taxonomy. **Pain**, v. 63, n. 1, p. 127-33, Oct 1995.

STEIN, C.; LANG, L. J. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. **Curr Opin Pharmacol**, v. 9, n. 1, p. 3-8, Feb 2009.

STEIN, C.; MACHELSKA, H. Modulation of peripheral sensory neurons by the immune system: implications for pain therapy. **Pharmacol Rev**, v. 63, n. 4, p. 860-81, Dec 2011.

SWISLOCKI, A. et al. A randomized clinical trial of the effectiveness of photon stimulation on pain, sensation, and quality of life in patients with diabetic peripheral neuropathy. **J Pain Symptom Manage**, v. 39, n. 1, p. 88-99, Jan 2010.

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

TAHA, R.; BLAISE, G. A. Update on the pathogenesis of complex regional pain syndrome: role of oxidative stress. **Can J Anaesth**, v. 59, n. 9, p. 875-81, Sep 2012.

TALWAR, R.; POTLURI, V. K. Cannabinoid 1 (CB1) receptor-pharmacology, role in pain and recent developments in emerging CB1 agonists. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 10, n. 5, p. 536-44, Aug 2011.

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

TAMAROVA, Z. A.; LYMANS'KYI IU, P.; HULIAR, S. O. Comparative testing of analgesia induced by polarized light and analgetics. **Fiziol Zh**, v. 51, n. 2, p. 57-64, 2005.

TAMBELI, C. H.; PARADA, C. A. Opioid Receptors. In: CAIRNS, B. E. (Ed.). Peripheral receptor targets for analgesia. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009.



TAMBELI, C. H. et al. Inhibition of tonic spinal glutamatergic activity induces antinociception in the rat. **Eur J Neurosci**, v. 16, n. 8, p. 1547-53, Oct 2002.

TAN, E. C. et al. Mitochondrial dysfunction in muscle tissue of complex regional pain syndrome type I patients. **Eur J Pain**, v. 15, n. 7, p. 708-15, Aug 2011.

TAN, E. C.; OYEN, W. J.; GORIS, R. J. Leukocytes in Complex Regional Pain Syndrome type I. **Inflammation**, v. 29, n. 4-6, p. 182-6, Dec 2005.

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

TREMBLAY, J. F. et al. Light-emitting diode 415 nm in the treatment of inflammatory acne: An open-label, multicentric, pilot investigation. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 8, n. 1, p. 31-33, 2006.

TUBOLY, G. et al. The antinociceptive interaction of anandamide and adenosine at the spinal level. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 91, n. 3, p. 374-9, Jan 2009.

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

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol**, v. 552, n. Pt 2, p. 335-44, Oct 15 2003.

UCEYLER, N. et al. Differential expression patterns of cytokines in complex regional pain syndrome. **Pain**, v. 132, n. 1-2, p. 195-205, Nov 2007.

VACCA, R. A. et al. Activation of mitochondrial DNA replication by He-Ne laser irradiation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 195, n. 2, p. 704-9, Sep 15 1993.

VACCA, R. A. et al. Increase of both transcription and translation activities following separate irradiation of the in vitro system components with He-Ne laser. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 203, n. 2, p. 991-7, Sep 15 1994.

- VINCK, E. et al. Pain reduction by infrared light-emitting diode irradiation: A pilot study on experimentally induced delayed-onset muscle soreness in humans. **Lasers in Medical Science**, v. 21, n. 1, p. 11-18, 2006.
- VINCK, E. et al. Evidence of changes in sural nerve conduction mediated by light emitting diode irradiation. **Lasers Med Sci**, v. 20, n. 1, p. 35-40, 2005.
- VINCK, E. M. et al. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers Med Sci**, v. 18, n. 2, p. 95-9, 2003.
- VINCK, E. M. et al. Green light emitting diode irradiation enhances fibroblast growth impaired by high glucose level. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 2, p. 167-171, 2005.
- VIVANCOS, G. G.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H. Opposite nociceptive effects of the arginine/NO/cGMP pathway stimulation in dermal and subcutaneous tissues. **Br J Pharmacol**, v. 138, n. 7, p. 1351-7, Apr 2003.
- WALKER, J. M.; HOHMANN, A. G. Cannabinoid mechanisms of pain suppression. **Handb Exp Pharmacol**, n. 168, p. 509-54, 2005.
- WALL, P. D. et al. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. **Pain**, v. 7, n. 2, p. 103-11, Oct 1979.
- WARD, U.; NILSSON, U. G. Acupuncture for postoperative pain in day surgery patients undergoing arthroscopic shoulder surgery. **Clin Nurs Res**, v. 22, n. 1, p. 130-6, Feb 2013.
- WASNER, G. et al. Vascular abnormalities in acute reflex sympathetic dystrophy (CRPS I): complete inhibition of sympathetic nerve activity with recovery. **Arch Neurol**, v. 56, n. 5, p. 613-20, May 1999.
- WEDLOCK, P. M.; SHEPHARD, R. A. Cranial irradiation with Gaalax laser leads to naloxone reversible analgesia in rats. **Psychol Rep**, v. 78, n. 3 Pt 1, p. 727-31, Jun 1996.

WELCH, S. P. Interaction of the cannabinoid and opioid systems in the modulation of nociception. **Int Rev Psychiatry**, v. 21, n. 2, p. 143-51, Apr 2009.

WESSELDIJK, F. et al. Six years follow-up of the levels of TNF-alpha and IL-6 in patients with complex regional pain syndrome type 1. **Mediators Inflamm**, v. 2008, p. 469439, 2008.

WEYDERT, C. J.; CULLEN, J. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nat Protoc**, v. 5, n. 1, p. 51-66, Jan 2010.

WHEELAND, R. G.; DHAWAN, S. Evaluation of self-treatment of mild-to-moderate facial acne with a blue light treatment system. **J Drugs Dermatol**, v. 10, n. 6, p. 596-602, Jun 2011.

WHELAN, H. T. et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 21, n. 2, p. 67-74, 2003.

WHELAN, H. T. et al. NASA light-emitting diodes for the prevention of oral mucositis in pediatric bone marrow transplant patients. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 20, n. 6, p. 319-324, 2002.

WHELAN, H. T. et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 19, n. 6, p. 305-314, 2001.

WILSEY, B. et al. Low-dose vaporized cannabis significantly improves neuropathic pain. **J Pain**, v. 14, n. 2, p. 136-48, Feb 2013.

WILSON-POE, A. R. et al. The periaqueductal gray contributes to bidirectional enhancement of antinociception between morphine and cannabinoids. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 103, n. 3, p. 444-9, Jan 2013.

WOODCOCK, J.; WITTER, J.; DIONNE, R. A. Stimulating the development of mechanism-based, individualized pain therapies. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 9, p. 703-10, Sep 2007.

WRIGHT, A.; SLUKA, K. A. Nonpharmacological treatments for

musculoskeletal pain. **Clin J Pain**, v. 17, n. 1, p. 33-46, Mar 2001.

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

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

YAMAURA, M. et al. Low level light effects on inflammatory cytokine production by rheumatoid arthritis synoviocytes. **Lasers Surg Med**, v. 41, n. 4, p. 282-90, Apr 2009.

YING, R. et al. Pretreatment with near-infrared light via light-emitting diode provides added benefit against rotenone- and MPP<sup>+</sup>-induced neurotoxicity. **Brain Res**, v. 1243, p. 167-73, Dec 3 2008.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **J Clin Pathol**, v. 54, n. 3, p. 176-86, Mar 2001.

YU, W.; NAIM, J. O.; LANZAFAME, R. J. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. **Lasers Surg Med**, v. 20, n. 1, p. 56-63, 1997.

ZAHN, P. K.; BRENNAN, T. J. Incision-induced changes in receptive field properties of rat dorsal horn neurons. **Anesthesiology**, v. 91, n. 3, p. 772-85, Sep 1999.

ZAHN, P. K.; BRENNAN, T. J. Primary and secondary hyperalgesia in a rat model for human postoperative pain. **Anesthesiology**, v. 90, n. 3, p. 863-72, Mar 1999.

ZEICHNER, J. A. Narrowband UV-B phototherapy for the treatment of acne vulgaris during pregnancy. **Arch Dermatol**, v. 147, n. 5, p. 537-9, May 2011.

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

ZOLLINGER, P. E. et al. Can vitamin C prevent complex regional pain syndrome in patients with wrist fractures? A randomized, controlled, multicenter dose-response study. **J Bone Joint Surg Am**, v. 89, n. 7, p. 1424-31, Jul 2007.