

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

Glauce Regina Pigatto

Envolvimento do sistema endógeno descendente de modulação da dor no controle antinociceptivo pela terapia com diodos emissores de luz

Araraquara, SP

2020

Glauce Regina Pigatto

Envolvimento do sistema endógeno descendente de modulação da dor no controle antinociceptivo pela terapia com diodos emissores de luz

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

Araraquara, SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

P683e Pigatto, Glauce Regina

Envolvimento do sistema endógeno descendente de modulação da dor no controle antinociceptivo pela terapia com diodos emissores de luz/
Glauce Regina Pigatto. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2020.

150f.

Tese (Doutorado)- Curso de Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – Universidade de Araraquara

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

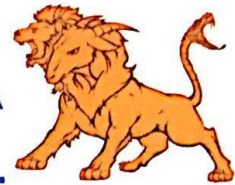
Coorientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

1. Diodos emissores de luz. 2. Dor. 3. Fotobiomodulação. 4. Sistemas inibitórios descendentes de dor. I. Título.

CDU 577.1:66



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA REGENERATIVA
E QUÍMICA MEDICINAL – PPGB-MRQM



GLAUCE REGINA PIGATTO

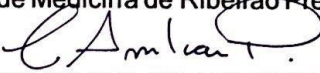
Tese apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.


Araraquara, 17 de fevereiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. NILVALDO ANTONIO PARIZOTTO (Orientador)
Universidade de Araraquara - UNIARA


Prof. Dr. NORBERTO CYSNE COIMBRA
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.


Prof. Dr. CARLOS AMILCAR PARADA
Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP.


Prof. Dr. RODRIGO ALVARO BRANDÃO LOPES MARTINS
Universidade do Vale do Paraíba/UNIVAP


Prof. Dr. CLEBER FERRARESI
Universidade Brasil – Campus de Itaquera/São Paulo.

Dedico esse trabalho a minha mãe Neusa e ao meu pai João (*in memoriam*),
por todo amor, paciência, dedicação e principalmente
por sempre confiarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Jesus, que tem proporcionado tudo na minha vida, o qual me direciona, sustenta, capacita e fez com que eu conquistasse mais essa vitória.

“O coração do homem pode fazer planos, mas resposta certa vem do Senhor”

Pv. 16.1

Ao meu pai João Pigatto (*in memoriam*), o qual será sempre o meu maior exemplo profissional e principalmente de caráter, é possível ser uns dos melhores, mantendo a simplicidade e humildade.

A minha mãe Neuza, que sem dúvida nenhuma é minha maior torcedora. Creio que você acredita mais mim do que eu mesma. Obrigada pelo seu amor, incentivo e, principalmente por acreditar em mim.

Ao meu irmão, outro torcedor e admirador meu, e que também acredita mais em mim que eu mesma, obrigada pela sua amizade, carinho e amor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto, pela orientação, amizade, atenção e constante aprendizado científico. Nesses quatro anos de convivência, cresci e aprendi muito com toda a sua expertise.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha, o qual admiro pela sua inteligência e por ser tão sagaz. Agradeço por abrir as portas de seu laboratório, direcionar-me, e assim, consolidar novas oportunidades científicas, o que permitiu que meu trabalho fosse executado com excelência acadêmica. São apenas dois anos e meio de convivência, porém, com um constante crescimento e aprendizado com toda a sua expertise.

Ao Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra, que também abriu as portas de seu laboratório, sempre solícito em discutir, ensinar e até mesmo ajudar em alguns momentos no meu trabalho. Agradeço por toda a atenção, carinho e também por todo aprendizado científico nesse tempo de convivência.

Agradeço também aos professores doutores, Adenilson de Souza da Fonseca e Rodrigo Labat Marcos, os quais me direcionaram até meu atual orientador, sempre atenciosos e solícitos comigo.

Como não agradecer ao Dr. Dario Baldo Junior e sua esposa Viviane, pessoas tão especiais, os quais conheci ao longo dessa caminhada, e hoje tenho o privilégio de tê-los como meus amigos.

Como não agradecer também a duas famílias tão especiais, Hernane e Helida, que me acolheram quando cheguei em Araraquara e ao Aluízio, Daisy e Julinha, que me acolheram muitas vezes em Ribeirão Preto e, assim, permitiram-me executar minha pesquisa.

Agradeço ao Prof. Dr. Quintino Moura Dias, o qual não conheço pessoalmente, mas parece que nos conhecemos há anos. Obrigada por toda a sua atenção e seus conhecimentos, sempre pronto a discutir pesquisa comigo, e contribuiu muito para que meus conhecimentos enriquecessem.

Às minhas amigas, Miriam e Andreza, as quais conheci por meio da pesquisa, obrigada por terem me acolhido no laboratório e por toda a ajuda e aprendizado de muitas técnicas. Mas agradeço em especial a Andreza (Deza), a qual se tornou minha parceira dos experimentos, obrigada pela sua amizade, pelas trocas de ideias, por toda a ajuda que certamente foi indispensável para que esse trabalho acontecesse.

Agradeço também, ao Alexandre (Ale) e Priscila (Pri), por todo o companheirismo, conversas, discussões de ideias e pela amizade de vocês.

Agradeço a todos os técnicos da USP, Ieda, Eleni, Katinha, Serginho, Bete, Roberta, Vani, Marquinhos, Afonso, Marcela, Juliana e Daoud, todos de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho e, também enriqueceram-me com seus conhecimentos. Porém, agradeço em especial, à Eleni, Bete, Roberta, Ieda e Katinha. Vocês são sensacionais!

A Sandrinha, secretária do programa, mesmo antes de eu ingressar ao programa e até hoje, sempre atenciosa e pronta para instruir e ajudar em tudo que eu precisei.

À CAPES pela bolsa concedida por um ano e à FAPESP, pelo suporte financeiro durante 3 anos de doutorado.

À Universidade de São Paulo e a Universidade de Araraquara e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade de realização deste curso.

Aos animais de laboratório, instrumentos de meu trabalho, todo o meu agradecimento e respeito.

“O mais competente não discute, domina a sua ciência e cala-se.”
(Voltaire)

Resumo

A dor aguda é uma resposta neurofisiológica normal e previsível a um dano tecidual, porém, pode se tornar persistente. O LED (do inglês, "Light Emitting Diode"), tem demonstrado ser eficaz em reduzir processos inflamatórios e dolorosos. No entanto, existem poucos estudos científicos sobre o mecanismo de ação do LED no controle da dor. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi estudar a hipótese do efeito antinociceptivo do LED infravermelho de baixa intensidade ser modulado pelo sistema endógeno descendente da dor em um modelo de nocicepção aguda. Foram utilizados 356 camundongos Swiss machos adultos (25 a 35g) com aproximadamente 2 meses de idade e foram submetidos ao pré-tratamento com o LED (890nm, 390mW, 468J, 20,8J/cm², 20min) e a irradiação infravermelha foi aplicada diretamente no lado ventral de todo o corpo do animal. Na primeira parte, foi realizada a comparação do efeito do LED em animais com e sem tricotomia, no qual apresentou importante efeito antinociceptivo no modelo de dor aguda promovido pelo cinamaldeído, e o pelo do animal não se mostrou constituir-se uma barreira para a penetração da luz, pois, não houve diferença entre os animais com e sem tricotomia. Na segunda parte, foi investigado por meio de ensaios farmacológicos administrados via intratecal (i.t.) ou intracerebroventricular (i.c.v.) o envolvimento de vários sistemas endógenos de modulação da dor. Os resultados demonstraram que parte do efeito analgésico do LED deve-se a possível ativação dos sistemas endógenos de modulação da dor, uma vez que, o efeito analgésico do LED foi prevenido por: WAY, ketanserina (sistema serotoninérgico), porém, nem a metisergida nem o MDL72222 foram capazes de prevenir o efeito antinociceptivo do LED. A fentolanamina, o prazosin, a yohimbina, o propranolol (sistema noradrenérgico), haloperidol (sistema dopaminérgico), naloxona (i.t. e i.c.v), CTOP (sistema opioidérgico), a bicuculina, o faclofeno (sistema GABAérgico) e a atropina e o hexametileno (sistema colinérgico) também se mostraram eficazes em modular o efeito do LED. Confirmado o envolvimento de alguns sistemas endógenos de modulação da dor, foram realizadas as técnicas de imunistoquímica, imunofluorescência e Western Blot para análise da proteína c-Fos no corno dorsal da medula espinal (CDME), para a verificação da efetividade da terapia no controle da dor. Da mesma forma, foram realizadas as técnicas de imunistoquímica e imunofluorescência e assim, investigar se o LED poderia aumentar a expressão da proteína c-Fos nas principais estruturas

supraespinais envolvidas no controle da dor. Quanto à expressão da proteína c-Fos, o cinamaldeído promoveu um aumento da sua expressão no corno dorsal da medula espinal uma alteração atenuada pelo tratamento com o LED. Em relação à expressão da proteína c-Fos nas estruturas supraespinais, o tratamento somente com o LED e o LED com o estímulo nocivo (cinamaldeído) promoveram um aumento da expressão da proteína c-Fos nas regiões ventrolateral e dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal (PAG, do inglês, “periaqueductal gray matter”), “locus coeruleus” (LC) e no núcleo magno da rafe (RMg, do inglês, “raphe magnus nucleus”). Confirmado a redução da expressão da proteína c-Fos no CDME e o aumento nas estruturas supraespinais (PAG, LC e RMg), na terceira parte, foi investigado a possível ativação das principais vias inibitórias descendentes da dor. Foi analisada por meio de injeções intratecais de três neurotoxinas 6-OHDA (promovem lesão de fibras noradrenérgicas e dopaminérgicas), DSP-4 (promove lesão de fibras noradrenérgicas) e 5,7-DHT (promove lesão de fibras serotoninérgicas). Após 3 dias das injeções, foi avaliado o efeito do LED no modelo do cinamaldeído na pata e na placa quente, em ambos os testes as três neurotoxinas preveniram o efeito do LED. Para confirmação das lesões com 6-OHDA e DSP-4, foi demonstrado por imunofluorescência uma redução de fibras imunorreativas para tirosina hidroxilase (TH) e dopamina β -hidroxilase (D β H) no corno dorsal da medula espinal e de fibras e neurônios imunorreativos no “locus coeruleus” (LC). Para a 5,7-DHT foi demonstrado por imunofluorescência uma redução de fibras imunorreativas para 5-HT no corno dorsal da medula espinal e uma redução de neurônios imunorreativos para triptofano hidroxilase (TPH) e 5-HT no núcleo magno da rafe (RMg). Uma vez confirmado o envolvimento das principais vias descendentes inibitórias da dor, foi realizada a técnica de imunofluorescência para a análise da expressão da proteína c-Fos no corno dorsal da medula espinal após a administração da neurotoxina DSP-4 e a 5,7-DHT. Os resultados demonstraram que o LED novamente reduziu a expressão da proteína c-Fos e esse aumento foi prevenido com a administração de DSP-4 ou 5,7-DHT. Na quarta parte, foi realizada uma caracterização farmacológica do efeito antinociceptivo do LED ser devido a ansiedade, uma vez que, foi observado o envolvimento do sistema noradrenérgico. Os animais irradiados com o LED aumentaram o número de entradas nos braços abertos e passaram uma quantidade maior de tempo nos braços abertos sugerindo que a exposição ao LED é ansiolítica. Na quinta parte, foi investigado a possibilidade da antinocicepção ser o resultado da redução da atividade locomotora dos animais,

para isto, foi realizado o teste do campo aberto. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa em relação ao número de cruzamentos entre os animais com e sem LED, assim, não houve comprometimento locomotor. Interessantemente, observou-se neste teste que os animais irradiados com LED permanecerem mais tempo na região central, novamente sugerindo um efeito ansiolítico. Os resultados apresentados evidenciaram alguns dos mecanismos neurobiológicos envolvidos no efeito terapêutico analgésico do LED (890nm, 20,8J/cm²) e atestam a favor de seu uso para o tratamento de quadros álgicos. No entanto, há necessidade de mais estudos para elucidar os mecanismos fotobiológicos envolvidos em seus efeitos terapêuticos e que atestem a favor de seu uso para o tratamento de condições dolorosas.

Palavras-chave: Diodos emissores de luz, Dor, Fotobiomodulação, Sistemas inibitórios descendentes de dor

Abstract

Acute pain is a normal and predictable neurophysiological response to tissue damage. However, it can become persistent. LED (Light Emitting Diode), has been shown to be effective in reducing inflammatory and painful processes. However, there are few scientific studies on the mechanism of action of LED on pain control. In this sense, the objective of this work was to study the mechanisms of action of the antinociceptive effect of low-intensity infrared LED in a model of acute nociception. Adult male Swiss mice (25 to 35g) were used, approximately 2 months old, and were subjected to pretreatment with the LED (890nm, 390mW, 468J, 20.8J/cm², 20min) and infrared irradiation was applied directly on the ventral side of the entire body of the animal. In the first part, the effect of the LED was compared on animals with and without trichotomy, in which it showed an important antinociceptive effect on acute pain model promoted by cinnamaldehyde, and the hair is not a barrier for light penetration. therefore, there was no difference between animals with and without trichotomy. In the second part, it was investigated through pharmacological tests administered via intrathecal (i.t.) or intracerebroventricular (i.c.v.) the involvement of several endogenous pain modulation systems. The results showed that part of the analgesic effect of the LED is due to the possible activation of the endogenous pain modulation systems, since the analgesic effect of the LED was prevented by: WAY, ketanserin (serotonergic drugs), however, neither metisergida, nor MDL72222 were not able to prevent the antinociceptive effect of the LED. Phentolanamine, prazosin, yohimbine, propranolol (noradrenergic drugs), haloperidol (dopaminergic drug), naloxone (i.t. and i.c.v), CTOP (opioidergic drugs), bicuculine, phaclofen (gabaergic drugs) and atropine, hexamethylene (cholinergic drugs) also proved effective in modulating the LED effect. Confirming the involvement of some endogenous pain modulation systems, immunohistochemistry, immunofluorescence and Western Blot techniques were performed to analyze the c-Fos protein in the dorsal horn of the spinal cord (CDME), to verify the effectiveness of therapy in the control of the pain. In the same way, immunohistochemistry and immunofluorescence techniques were performed and, thus, investigate whether the LED could increase the expression of the c-Fos protein in the main supraspinal structures involved in pain control. As for the expression of the c-Fos protein, cinnamaldehyde promoted an increase in its expression in the dorsal horn of the spinal cord, an alteration attenuated by the treatment with the LED. Regarding the expression of c-Fos protein in supraspinal structures, treatment with

LED and LED with noxious stimulus (cinnamaldehyde) promoted an increase in the expression of c-Fos protein in the ventrolateral and dorsolateral regions of the periaqueductal gray matter (PAG), “locus coeruleus” (LC) and in the raphe magnus nucleus (RMg). Confirmed the reduction in the expression of c-Fos protein in the CDME and the increase in supraspinal structures (PAG, LC and RMg), in the third part, the possible activation of the main inhibitory descending pain pathways was investigated. It was analyzed using intrathecal injections of three neurotoxins, such as the 6-OHDA (that lesion of noradrenergic and dopaminergic fibers), DSP-4 (that lesion of noradrenergic cells and fibers) and 5,7-DHT (that lesion of serotonergic cells and fibers). After 3 days of the administration, the effect of the LED on the acute pain model with cinnamaldehyde administered in the paw and the hot plate test was evaluated. In both tests, the three neurotoxins prevented the LED effect. To confirm the lesions with 6-OHDA and DSP-4, immunofluorescence demonstrated a reduction of immunoreactive fibers for tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine β -hydroxylase (D β H) in the dorsal horn of the spinal cord and of fibers and immunoreactive neurons in the “locus coeruleus”. For the 5,7-DHT neurotoxin, immunofluorescence demonstrated a reduction in immunoreactive fibers to 5-HT in the dorsal horn of the spinal cord and a reduction in immunoreactive neurons for tryptophan hydroxylase (TPH) and 5-HT in the raphe magnus nucleus. Once the involvement of the main descending pain inhibitory pathways was confirmed, the immunofluorescence technique was used to analyze the expression of the c-Fos protein in the dorsal horn of the spinal cord after the administration of the neurotoxin DSP-4 or 5,7-DHT . The results demonstrated that the LED again reduced the expression of the c-Fos protein and this increase was prevented with the administration of DSP-4 or 5,7-DHT. In the fourth part, a pharmacological characterization of the antinociceptive effect of the LED was due to anxiety, since the involvement of the noradrenergic system was observed. Animals irradiated with the LED increased the number of entries in the open arms and spent a greater amount of time in the open arms of the elevated plus-maze suggesting that the exposure to the LED is anxiolytic. In the fifth part, the possibility of antinociception being the result of the reduction of the locomotor activity of the animals was investigated, for this, the test of the open field was carried out. The results showed that there was no significant difference in relation to the number of crossings between animals with and without LED, thus, there was no locomotor impairment. Interestingly, it was observed in this test that animals irradiated with LED stay longer in the central

region, again suggesting an anxiolytic effect. The results presented showed some of the neurobiological mechanisms involved in the analgesic therapeutic effect of LED (890nm, 20.8J/cm²) and support its use for the treatment of pain. However, there is a need for further studies to elucidate the photobiological mechanisms involved in the therapeutic effects of LED and supporting its use for the treatment of painful conditions.

Key words: LED. Pain. Photobiomodulation. Pain descending inhibitory systems.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Nocicepção.....	33
Figura 2 - Representação esquemática das diferenças anatômicas e funcionais das fibras sensoriais aferentes primárias	36
Figura 3 - Representação esquemática da inserção das fibras sensoriais aferentes primárias no corno dorsal da medula.....	38
Figura 4 - Três das principais vias ascendentes que transmitem a informação nociceptiva a partir da medula espinal aos centros superiores	40
Figura 5 - Mecanismos envolvidos na sensibilização periférica durante a inflamação.....	43
Figura 6 – Os principais sistemas modulatórios ascendente (a) e descendente (b)....	47
Figura 7 - LED e Junção P-N. (A) LED; (B) Junção P N.....	50
Figura 8 - Profundidade de penetração x comprimento de onda (λ)	52
Figura 9 - Cadeia respiratória mitocondrial que consiste contém cinco complexos de proteínas integrais de membrana.....	54
Figura 10 - Fotodissociação proposta do NO a partir da citocromo c oxidase (CCO).....	55
Figura 11 - Representação esquemática das vias de sinalização celular desencadeadas pela PBM.....	56
Figura 12 - Processos específicos de tecidos que ocorrem após FBM e beneficiam uma variedade de distúrbios cerebrais.....	58
Figura 13 - Representação esquemática da aplicação do LED (890nm).....	63
Figura 14 - Representação esquemática da comparação do tratamento do LED (890nm; 20,8J/cm ²) em animais com e sem tricotomia.....	64
Figura 15 - Representação esquemática dos ensaios farmacológicos administrados via intratecal. (X) representa o tempo após a administração do(s) antagonista(s) de cada sistema estudado, já explicado no item 5.3.2.1.....	66
Figura 16 - Representação esquemática do ensaio farmacológico administrado via intracerebroventricular.....	67
Figura 17 - Representação esquemática da lesão neurotóxica administrada via intratecal.....	68

Figura 18 - Representação esquemática da caracterização farmacológica com DSP-4 (20µg/i.t.) no LCE.....	70
Figura 19 - Representação esquemática da avaliação locomotora após exposição ao LED no teste do campo aberto.....	71
Figura 20 - Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm ²) com e sem tricotomia sobre o comportamento nociceptivo após intraplantar de cinamaldeído.....	75
Figura 21 - Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo do LED.....	76
Figura 22 - Envolvimento do sistema noradrenérgico no efeito antinociceptivo do LED.....	77
Figura 23 - Envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito antinociceptivo do LED.....	78
Figura 24 - Envolvimento do sistema opioidérgico no efeito antinociceptivo do LED.....	79
Figura 25 - Envolvimento do sistema GABAérgico no efeito antinociceptivo do LED.....	80
Figura 26 - Envolvimento do sistema colinérgico no efeito antinociceptivo do LED.....	81
Figura 27 - Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm ²) na quantificação de c-Fos no corno dorsal da medula espinal dorsal de camundongos.....	82
Figura 28 – Figuras representativas do efeito do LED (890nm; 20,8J/cm ²) na quantificação de c-Fos no corno dorsal da medula espinal dorsal de camundongos.....	83
Figura 29 - Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm ²) sobre a expressão proteica de c-Fos no corno dorsal da medula espinal dorsal de camundongos.....	84
Figura 30 - Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm ²) na quantificação de c-Fos na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral e dorsolateral de camundongos.....	85
Figura 31 - Figuras representativas do efeito do LED (890nm; 20,8J/cm ²) na quantificação de c-Fos na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral e dorsolateral de camundongos, respectivamente.....	86
Figura 32 - Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm ²) na quantificação de c-Fos no “locus coeruleus” de camundongos.....	88

Figura 33 - Figuras representativas do efeito do LED (890nm; 20,8J/cm ²) na quantificação de c-Fos no “locus coeruleus” de camundongo.....	89
Figura 34 - Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm ²) na quantificação de c-Fos no núcleo magno da rafe de camundongos.....	90
Figura 35 – Figuras representativas do efeito do LED (890nm; 20,8J/cm ²) na quantificação de c-Fos no núcleo magno da rafe de camundongos.....	91
Figura 36 - A administração intratecal de 6-OHDA (20µg/i.t.) reduz o efeito antinociceptivo do LED no teste do cinamaldeído e placa quente.....	92
Figura 37 - A administração intratecal de DSP-4 (20µg/i.t.) reduz o efeito antinociceptivo do LED no teste do cinamaldeído e placa quente.....	93
Figura 38 - Figuras representativas de fibras imunorreativas para tirosina hidroxilase (TH) e dopamina β-hidroxilase (DβB) do corno dorsal da medula espinal.....	94
Figura 39 - Figuras representativas de fibras imunorreativas para tirosina hidroxilase (TH) e dopamina β-hidroxilase (DβB) do corno dorsal da medula espinal após administração intratecal de 6-OHDA (20µg/i.t.).....	95
Figura 40 - Figuras representativas de fibras imunorreativas para tirosina hidroxilase (TH) e dopamina β-hidroxilase (DβB) do corno dorsal da medula espinal antes e após administração intratecal de DSP-4 (20µg/i.t.).....	96
Figura 41 - Figuras representativas de fibras imunorreativas para tirosina hidroxilase (TH) no corno dorsal da medula espinal antes e após administração intratecal de 6-OHDA (20µg/i.t.) e DSP-4 (20µg/i.t.).....	97
Figura 42 - Figuras representativas de fibras imunorreativas para dopamina β-hidroxilase (DβB) no corno dorsal da medula espinal antes e após administração intratecal de 6-OHDA (20µg/i.t.) e DSP-4 (20µg/i.t.).....	98
Figura 43 - Figuras representativas de fibras e células imunorreativas para tirosina hidroxilase (TH) no “locus coeruleus” antes e após administração intratecal de 6-OHDA (20µg/i.t.) e DSP-4 (20µg/i.t.).....	99
Figura 44 - Figuras representativas de fibras e células imunorreatividade para tirosina hidroxilase (TH) no locus coeruleus antes e após administração intratecal de 6-OHDA (20µg/i.t.) e DSP-4 (20µg/i.t.).....	100

Figura 45 - Figuras representativas de fibras e células imunorreativas para dopamina β -hidroxilase (D β B) no “locus coeruleus” antes e após administração intratecal de 6-OHDA (20 μ g/i.t.) e DSP-4 (20 μ g/i.t.).....	101
Figura 46 - Figuras representativas de fibras e células imunorreativas para dopamina β -hidroxilase (D β B) no “locus coeruleus” antes e após administração intratecal de 6-OHDA (20 μ g/i.t.) e DSP-4 (20 μ g/i.t.).....	102
Figura 47 - A administração intratecal de 5,7 – DHT (50 μ g/i.t.) reduz o efeito antinociceptivo do LED no teste do cinamaldeído e placa quente.....	103
Figura 48 - Figuras representativas de células imunorreativas para triptofano hidroxilase (TPH) no núcleo magno da rafe antes e após administração intratecal de 5,7-DHT (50 μ g/i.t.).....	104
Figura 49 - Figuras representativas de células imunorreativas para triptofano hidroxilase (TPH) no núcleo magno da rafe antes e após administração intratecal de 5,7-DHT (50 μ g/i.t.).....	105
Figura 50 - Figuras representativas de fibras imunorreativas para 5-hidroxitriptamina (5-HT) no corno dorsal da medula espinal.....	106
Figura 51 - Figuras representativas de fibras imunorreativas para 5-hidroxitriptamina (5-HT) no corno dorsal da medula espinal após administração intratecal de 5,7-DHT (50 μ g/i.t.).....	107
Figura 52 - Figuras representativas de fibras imunorreativas para (5-HT) no corno dorsal da medula espinal antes e após administração intratecal de 5,7-DHT (50 μ g/i.t.).....	108
Figura 53 - Figuras representativas de neurônios imunorreativos para 5-hidroxitriptamina (5-HT) no núcleo magno da rafe antes e após administração intratecal de 5,7-DHT (50 μ g/i.t.).....	108
Figura 54 - Figuras representativas de neurônios imunorreativos para 5-hidroxitriptamina (5-HT) no núcleo magno da rafe antes e após administração intratecal de 5,7-DHT (50 μ g/i.t.).....	109

Figura 55 - Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm ²) na quantificação de c-Fos no corno dorsal da medula espinal de camundongos antes e após administração intratecal de DSP-4 (20µg/i.t.).....	110
Figura 56 - Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm ²) na quantificação de c-Fos no corno dorsal da medula espinal de camundongos antes e após administração intratecal de 5,7-DHT (50µg/i.t.).....	112
Figura 57 - Efeito do LED (890; 20,8J/cm ²) no comportamento semelhante à ansiedade no teste do labirinto cruzado elevado com e sem administração intratecal DSP-4 (20µg/i.t.).....	114
Figura 58 - Efeito do LED (890; 20,8J/cm ²) no comportamento semelhante à ansiedade e da atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HIAA - Ácido 5-hidroxi-indolacético

5-HT - 5 hidroxitriptamina, serotonina

5-HT_{1A}R - Receptor de Serotonina 5-HT_{1A}

5-HT_{2A}R - Receptor de Serotonina 5-HT_{2A}

5-HT₃R - Receptor de Serotonina 5-HT₃

5,7-DHT – Di-hidroxitriptamina

6-OHDA - Hidroxidopamina

AC - Adenilato ciclase

ACh - Acetilcolina

AINE - Anti-inflamatório não esteroide

ALT- Alanina aminotransferase

AMPA - α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato

AMPC - Monofosfato de adenosina cíclico

ASIC - Canal iônico sensível a ácido

AST - Aspartato aminotransferase

ATP - Adenosina trifosfato

BDNF - Fator neurotrófico derivado do encéfalo

BK - Bradicinina

BSA - Albumina de soro bovino

CCK - Colecistocinina

CD - Corno dorsal

CDME - Corno dorsal da medula espinal

CEUA - Comissão de Ética no uso de Animais

CGRP - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

Cox - Citocromo c oxidase

CTOP - D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂

DA - Dopamina

DH – Dopamina β -Hidroxilase

DSP- 4 – N - (2-cloroetil) - N-etil-2-bromobenzilamina

DYN - Dinorfina

EPM - Erro padrão da média

ENK - Encefalina

EP - Receptor prostanóide E

ERK - Cinase regulada por sinal extracelular

EXIN - Interneurônios excitatórios

FADH₂ - Dinucleótido de adenina flavina

FTC β - Fator transformador de crescimento β

GABA - Ácido gama amino-butírico

GGT - Gama glutamil transferase

GJ - Gânglio jugular

GN - Gânglio nodoso

GPCRs - Receptores acoplados à proteína G

GRD - Gânglio da raiz dorsal do nervo espinal

GT - Gânglio trigeminal

HDL - High density lipoprotein

i.p. - Via intraperitoneal

i.pl. - Via intraplantar

i.t. - Via intratecal

IASP - Associação internacional para o estudo da dor

IL-10 - Interleucina 10

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

ININ - Interneurônios inibitórios

K₂P - Canal de potássio 2 poros

K_v - Canais de potássio controlados por voltagem

LASER - Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação

LC – “Locus coeruleus”

LDL – “Low density lipoprotein”

LEDT – “Light Emitting Diode Therapy”

LIF - Fator inibitório da leucemia

LLLT – “Low Level Laser Therapy”

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NaV - Canal de sódio controlado por voltagem de subunidade alfa

NCHS – “National Center for Health Statistics”

NF-KB - Fator nuclear B

NGF - Fator de crescimento neural

NIR - Próximo ao infravermelho

NK-1R - (Neurocinina 1)

NKA - Neurocinina A

NKB - Neurocinina B

NMDA - N-metil D-Aspartato

RMG - Núcleo magno da Rafe

NO - Óxido nítrico

M1 - Receptores muscarínicos 1

M2 - Receptores muscarínicos 2

OMS - Organização mundial da saúde

P2X - Receptor purinérgico ionotrópico

P2Y - Receptor purinérgico acoplado à proteína G

PAF - Fator ativador plaquetário

PAFs - Fibras aferentes primárias

PAG- Substância cinzenta periaquedutal

PAGvl - Substância cinzenta periaquedutal ventral

PAGdl - Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral

FBM - Fotobiomodulação

PBS - Solução tampão fosfato

PFA - Paraformaldeído

PG - Prostaglandina

PGE₂ - Prostaglandina E₂

PGI₂ - Prostaciclina

pH - Potencial hidrogeniônico

PKA - Proteína cinase A

PKC - Proteína cinase C

PLC - Fosfolipase C

PNs - Neurônios de projeção

rACC- córtex cingulado anterior rostral

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RVM- Bulbo ventromedial rostral

SARA - Sistema ativador reticular ascendente

SG - Substância gelatinosa

SNC - Sistema nervoso central

SNI - Lesão do nervo poupado

SNP- Sistema nervoso periférico

SP- Substância P

TBARS - Ácido tiobarbitúrico reativo

TLR- Toll like receptor

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Tr- Receptores tirosina-cinase

TRP- Receptor de potencial transitório

TRPA - Receptor de potencial transitório da subfamília anquirina

TRPA1- Receptor de potencial transitório da subfamília anquirina, membro 1

TH – Tirosina hidroxilase

TPH – Triptofano hidroxilase

UNESP - Universidade Estadual Paulista

UNIARA - Universidade de Araraquara

USP - Universidade de São Paulo

VGICs - Canais iônicos controlados por voltagem

WHO - Organização mundial da saúde

TABELAS

Tabela 1- Parâmetros envolvidos na determinação da fototerapia.....51

Tabela 2 - Parâmetros utilizados com o LED utilizado no trabalho.....63

Sumário

1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1 Dor – Considerações gerais	29
2.2 Classificação da dor	30
2.3 Fisiopatologia da dor	31
2.3.1 Nociceptores	32
2.3.2 Transdução sensorial	33
2.3.3 Canais iônicos	34
2.3.4 Fibras nociceptivas	35
2.3.5 Transmissão sensorial	36
2.3.6 Percepção e processamento da dor	40
2.4 Sensibilização periférica	41
2.5 Dor aguda	44
2.6 Mecanismos centrais do controle da dor	44
2.7 Fotobiomodulação (FBM)	48
2.7.1 Parâmetros	50
2.7.2 Mecanismo de ação	52
3 JUSTIFICATIVA	60
4 OBJETIVOS	61
4.1 Objetivo geral	61
4.2 Objetivos específicos	61
5 MATERIAL E MÉTODOS	62
5.1 Animais	62
5.2 Aplicação do LED	62
5.3 Protocolos experimentais	64
5.3.1 Parte I - Comparação do LED (890nm, 20,8J/cm²) em animais com e sem tricotomia no modelo de nocicepção induzida por cinamaldeído administrado por via intraplantar	64
5.3.2 Parte II - Ensaio farmacológico	65
5.3.3 - Parte III - Lesões com neurotoxinas seletivas de vias monoaminérgicas ...	67
5.3.4 – Parte IV - Caracterização farmacológica do efeito antinociceptivo do LED (890; 20,8J/cm²) no comportamento semelhante à ansiedade aferido no teste do labirinto em cruz elevado (LCE)	69
5.3.5 – Parte V - Teste do campo aberto	70
5.4 - Imunomarcção da proteína c-Fos, tirosina hidroxilase (TH), dopamina-β-hidroxilase (DβH), triptofano hidroxilase (TPH) e 5-hidroxitriptamina (5-HT)	71

5.4.1 Ensaio de imunistoquímica.....	71
5.4.2 Ensaio de imunofluorescência	72
5.4.3 Análise por “Western Blotting”	73
5.5 Eutanásia	74
5.6 Análise estatística	74
6 RESULTADOS	75
6.1 Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm ²) na nocicepção induzida por cinamaldeído em animais com e sem tricotomia.....	75
6.2 Envolvimento do sistema serotoninérgico.....	75
6.3 Envolvimento do sistema Noradrenérgico	76
6.4 Envolvimento do sistema Dopaminérgico.....	77
6.5 Envolvimento do sistema opioidérgico	78
6.6 Envolvimento do sistema GABAérgico	79
6.7 Envolvimento do sistema Colinérgico	80
6.8 Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm ²) na quantificação de c-Fos no corno dorsal da medula espinal dorsal de camundongos.....	81
6.9 Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm ²) na quantificação da expressão proteica de c-Fos por Western Blotting no corno dorsal da medula espinal de camundongos	83
6.10 Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm ²) na quantificação de c-Fos na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral e dorsolateral, “locus coeruleus” e núcleo magno da rafe de camundongos	84
6.11 Envolvimento do sistema monoaminérgico.....	91
6.12 Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm ²) na quantificação de c-Fos no corno dorsal da medula espinal dorsal de camundongos com administração por via intratecal de DSP-4 (20µg/i.t.) e 5,7-DHT (50µg/i.t.)	109
6.14 Efeito do LED (890; 20,8J/cm ²) no comportamento semelhante à ansiedade expresso no teste do labirinto em cruz elevado com e sem administração por via intratecal de DSP-4 (20µg/i.t.).....	113
6.15 Efeito do LED (890; 20,8J/cm ²) no comportamento da atividade locomotora ..	114
7 DISCUSSÃO	116
8 CONCLUSÕES	129
9 REFERÊNCIAS.....	130
ANEXOS	146

1 INTRODUÇÃO

Segundo a organização mundial da saúde a biotecnologia refere-se a qualquer tecnologia que tem uma base biológica. Embora tenha raízes históricas, a biotecnologia moderna é em grande parte desenvolvida em laboratório e gira em torno de estudos moleculares. Existe um grande número de projetos biotecnológicos que têm o potencial para ajudar a combater doenças infecciosas, de mapeamento do genoma e engenharia genética, é de característica ampla e continua a expandir-se com os avanços na pesquisa científica (WHO, 2007).

A inclusão de novas tecnologias com potenciais terapêuticos característicos oferece um maior gerenciamento e melhoria de diversas patologias, e assim, contribuir diretamente para melhorar o desenvolvimento e a saúde humana. Dessa forma, a medicina regenerativa consiste em um conjunto de conhecimentos e tecnologias, e tem como objetivo um melhor direcionamento e ampliação de técnicas utilizadas no processo de reparo e/ou a substituição de tecidos ou órgãos lesados (WINSTEIN; REQUEJO, 2015).

Da mesma forma, a organização mundial da saúde está totalmente comprometida em garantir que crianças e adultos com dor tenham acesso a medicamentos eficazes para controle de quadros álgicos (REIDENBERG, 2007; WHO, 2017). A organização mundial da saúde também reconhece que a necessidade de acesso ao alívio da dor deve ser equilibrada com as preocupações e os danos decorrentes do uso indevido de medicamentos prescritos para o tratamento da dor (KNAUL, 2017; WHO, 2017). Assim, dispositivos médicos, auxiliares e soluções de cuidados com a saúde, são componentes importantes de tecnologia relacionados à mesma, que podem salvar vidas e melhorar a qualidade de vida e bem-estar (WHO, 2014).

A dor é um dos sintomas clínicos mais comuns que induz à procura de cuidados médicos nos serviços primários de saúde e também para o uso de medicamentos. A fisiopatologia da dor é um processo complexo que varia de acordo com a duração (por exemplo, aguda, crônica) ou tipo (por exemplo, nociceptiva, neuropática e nociplástica). Profissionais da saúde devem entender os caminhos que levam à dor para melhor auxiliar na gestão de sintomas de dor dos pacientes (KYRANOU; PUNTILLO, 2012; RADNOVICH *et al.*, 2015).

O tratamento adequado da dor ainda é considerado um desafio terapêutico, tanto em países desenvolvidos, como naqueles em desenvolvimento, e é estimado que 80% da população mundial têm acesso limitado a medicamentos para tratamento da dor moderada a grave. Além disso, os fármacos utilizados para o tratamento da dor, muitas vezes apresentam limitada eficácia e/ou significativos efeitos adversos que comprometem sua utilização por período prolongado (SCHAIBLE, 2014; KIGUCHI *et al.*, 2017). Reconhecendo que as tecnologias de saúde equipam os provedores de saúde com ferramentas indispensáveis para a prevenção, tratamento, reabilitação e a consecução efetiva e eficiente de metas de desenvolvimento relacionadas à saúde, novas tecnologias entram no mercado de desenvolvimento da pesquisa, como por exemplo, as que utilizam a luz como tratamento, com base em seu impacto sobre muitas doenças, assim como assegurando o seu uso de forma eficaz (WINSTEIN; REQUEJO, 2015; TSAI e HAMBLIN, 2017).

O termo fotobiomodulação (FBM) (PBM, do inglês, “photobiomodulation”), diz respeito à intervenção terapêutica não invasiva com luz, realizadas com diodos de LED (do inglês, “Diode Emitting Light”); Diodos Emissores de Luz ou LASER (do inglês, “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”; Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação). O mecanismo de ação da fotobiomodulação, inclui modulação dos níveis de cálcio, mediadores inflamatórios, substâncias endógenas, assim como a ativação de uma ampla gama de fatores de transcrição, levando a uma nova síntese proteica (TSAI; HAMBLIN, 2017; HEISKANEN; HAMBLIN, 2018). Embora a FBM tem sido utilizada clinicamente para o tratamento da dor, ainda não está claro quais substratos moleculares (receptores) estão implicados nos mecanismos celulares da FBM. Assim, mesmo com poucas evidências da literatura apoiando o papel das vias descendentes inibitórias da dor provenientes de estruturas encefálicas como moduladoras da dor, não há evidências consistentes para a ligação entre a ação terapêutica da FBM e a sinalização dessas vias durante a resposta nociceptiva. Portanto, a compreensão do mecanismo descendente que controla o processo de antinocicepção promovido pela FBM, pode contribuir para elucidar os mecanismos neurobiológicos na ciência básica, e igualmente favorecer possíveis aplicações na clínica para o alívio da dor.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Dor – Considerações gerais

A experiência dolorosa é fundamental e faz parte do desenvolvimento cultural de todas as sociedades. Na história da dor, os poderes “sobrenaturais” tiveram um papel tão importante quanto os fatores naturais. Considerar a dor como o resultado de uma “comunicação” entre os homens e os poderes divinos é um pressuposto fundamental para muitas sociedades. Quanto mais as sociedades se distanciam da medicina ocidental, ou medicina moderna, mais prevalente é essa visão da dor. Por outro lado, uma teoria puramente médica baseada em fenômenos naturais independentes dos poderes divinos foi desenvolvida há muito tempo (MOAYEDI; DAVIS, 2013; GOLDBERG, 2017).

A teoria científica mais importante é radicalmente centrada na mecânica da dor no início da idade moderna vem do filósofo francês René Descartes. Em seu conceito, o antigo pressuposto de que a dor era representada no coração foi abandonado. O cérebro havia assumido o lugar do coração. Apesar de sua parcialidade, a teoria de Descartes abriu as portas para que a neurociência explicasse os mecanismos da dor (BALIKI; APKARIAN, 2016).

Várias teorias da dor surgiram durante o século XX. A mais importante é do psicólogo canadense Ronald Melzack e do psicólogo britânico Patrick D. Wall. Essa teoria foi publicada em 1965 e é conhecida como a “teoria de controle do portão da dor”. O termo “portão” foi adotado para descrever os mecanismos da medula espinal que regulam a transmissão dos impulsos dolorosos entre a periferia e o cérebro. Essa teoria foi importante porque não mais considerava o sistema nervoso central (SNC) como um simples meio passivo de transmissão de sinais nervosos. Implicava que o sistema nervoso central alterava “ativamente” a transmissão dos impulsos nervosos (MELZACK; WALL, 1965). No entanto, a “teoria de controle do portão da dor” enfatizava uma visão estritamente neurofisiológica da dor, ignorando os fatores psicológicos e as influências culturais.

Em 1979, a IASP cunhou a importante definição da dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano real ou potencial de tecidos ou descrita em termos de tal dano”, que ainda é válida (LOESER; TREEDE, 2008). Essa definição foi importante porque pela primeira vez ficou implícito que dor nem sempre é uma consequência de dano tecidual, e pode ocorrer sem ele. A ciência ocidental

então começou a perceber que fatores somáticos (dano tecidual) não podem ser separados de fatores psicológicos (aprendizado, lembrança, a alma e processos afetivos). Junto com o reconhecimento das influências sociais na percepção dolorosa, esses fatores formam o núcleo do conceito biopsicológico da dor.

Assim, a dor contempla um componente emocional relacionado à origem do caráter desagradável da dor, bem como um componente sensorial denominado nocicepção, o qual se relaciona ao processamento e codificação de estímulos nocivos (LOESER; TREEDE, 2008; JENSEN *et al.*, 2011). Contudo, é factível que a exacerbação do quadro algíco reduz drasticamente a qualidade de vida do indivíduo e a persistência dos sintomas podem causar reações emocionais negativas tornando-se debilitante e causadora de sofrimento.

2.2 Classificação da dor

Didaticamente, a dor pode ser classificada de acordo com a (1) duração do quadro algíco e os (2) mecanismos implicados na origem do sintoma.

A dor aguda é uma resposta psicofisiológica dinâmica, complexa e desagradável ao trauma tecidual e processos inflamatórios agudos relacionados. Normalmente, a dor aguda é autolimitada e confinada a um determinado período de tempo (TRACEY; JOHNS, 2010; WOOLF, 2010). Porém, quando a lesão ou inflamação é prolongada, a excitação contínua dos neurônios nociceptivos primários causam a dor crônica (MILLIGAN; WATKINS, 2009). Na literatura, considera-se dor crônica quando o sintoma ultrapassa 3 a 6 meses de duração (TREEDE *et al.*, 2015).

Quanto à origem, a dor pode ser dividida em (1) nociceptiva, dor que é um sistema de proteção fisiológica de alerta precoce, essencial para detectar e minimizar o contato com estímulos prejudiciais ou nocivos. Consiste na ativação direta dos nociceptores (WOOLF, 2010; DAVIS *et al.*, 2017). Ocorre em resposta à lesão tecidual e à resposta inflamatória subsequente. A sensibilidade aumentada ocorre dentro da área inflamada e em áreas não-inflamadas contíguas, como resultado da plasticidade em nociceptores periféricos e vias nociceptivas centrais (WOOLF, 2010; DAVIS *et al.*, 2017). (2) Neuropática, frequentemente associada a trauma direto, doença e/ou inflamação persistente e é produzida por danos nos nervos periféricos ou por lesões do SNC. (LOESER; TREEDE, 2008; TREEDE *et al.*, 2015). (3) Nociplástica, onde não há dano no tecido e, conseqüentemente, não há ativação dos receptores de dor. O mecanismo envolvido é a sensibilização central (MILLAN, 1999; NAKAMURA *et al.*, 2014).

2.3 Fisiopatologia da dor

Desde a antiguidade, as ideias relacionadas à dor foram bastante diversificadas. Na Grécia antiga, foi Aristóteles (384-322 a.C.) quem apresentou o impacto mais significativo no futuro entendimento sobre as sensações. Aristóteles entendia o tato como sendo um dos cinco sentidos principais, junto com a visão, olfato, audição e paladar, e acreditava que o tato estava diretamente relacionado à sensação de dor, reconhecendo sua direta correlação com um dano tecidual. Seguindo essa linha, Herophilus (335-280 a.C.) propunha ser o cérebro o órgão responsável pela consciência e sensações, reconhecendo que nervos periféricos seriam a ligação com a medula espinal, controlando as sensações e os movimentos, ideia que foi, mais tarde, confirmada por Galeno (130-201) (PERL, 2012). No entanto, foi Avicenna (980-1037), filósofo e fisiologista persa, quem relatou que, em condições de doença, a dor poderia ser dissociada do reconhecimento do tato e temperatura, propondo, então, que a dor seria uma sensação independente (PERL, 2007).

A partir dos anos 1800, foram propostas muitas teorias a respeito do processamento da dor. Charles Bell, em 1811, formulou a ideia de que os nervos sensoriais eram especializados em sua função, ou seja, adaptados para detectar e transmitir a informação gerada por um determinado estímulo. Vários outros fisiologistas estenderam os conhecimentos da época, e por volta dos anos 1880, várias propostas já assinalavam o papel essencial de um mecanismo espinal de condução da informação gerada por um estímulo doloroso. O modo de detecção desse estímulo nocivo, no entanto, foi proposto por Charles Sherrington em 1906, como sendo devido a estruturas sensoriais específicas, mais tarde denominadas nociceptores (PERL, 2007). A partir daí inicia-se uma intensa busca pelo entendimento dos processos envolvidos na transdução, transmissão e percepção da dor, sendo relatados inúmeros estudos que culminam com os conhecimentos atuais.

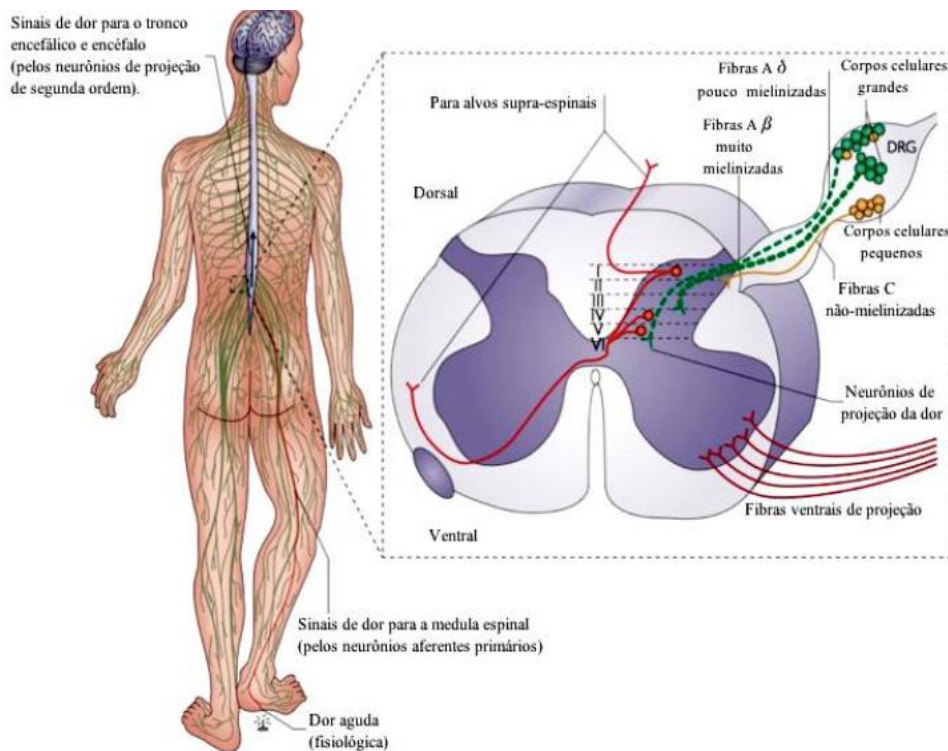
Assim, o primeiro passo na sequência dos eventos que originam o fenômeno doloroso é a transformação dos estímulos nocivos em potenciais de ação (transdução sensorial) que, das fibras nervosas periféricas, são transferidos para o SNC (transmissão sensorial). O segundo estágio é referente ao processamento elaborado dessa informação nociceptiva, levando à percepção consciente da dor (BASBAUM *et al.*, 2009).

2.3.1 Nociceptores

De acordo com a proposta de Sherrington, o processo de transdução ocorre a partir do estímulo de estruturas periféricas específicas para dor, os nociceptores. Estes são as terminações nervosas livres das fibras aferentes sensoriais de primeira ordem, presentes nos neurônios nociceptivos (pseudounipolares) (BASBAUM *et al.*, 2009). Eles são ativados quando o estímulo é intenso (possuem alto limiar de ativação), ou seja, nem toda fibra sensorial conduz informação dolorosa (MILLAN, 1999; BASBAUM *et al.*, 2009). Dessa forma, a função básica dos nociceptores é de transmitir informações sobre a lesão tecidual ocasionada por estímulos nocivos aos neurônios de ordem superior (Figura 1) (JULIUS; BASBAUM, 2001; DUNNE *et al.*, 2018).

Os nociceptores estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras (JULIUS; BASBAUM, 2001). Dividem-se em quatro classes: os mecanoceptores, sensíveis a estímulos mecânicos intensos; os termoceptores, sensíveis a estímulos térmicos (igual ou acima de 42°C ou menor que 5°C), os polimodais, sensíveis tanto a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (BESSON, 1999; DUNNE *et al.*, 2018) e os chamados nociceptores silenciosos (silente ou sleeping) que normalmente não respondem a estímulos. No entanto, quando estimulados por mediadores inflamatórios ou após a administração de agentes flogísticos (pró-inflamatórios), estes nociceptores apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizados e, assim, passam a responder a estímulos sensoriais mecânicos e térmicos nociceptivos e não nociceptivos (este último representando a alodínia). As estimativas são de que 40% das fibras C e 30% das fibras A δ contribuem com nociceptores silenciosos (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Figura 1 - Nocicepção. O desenho esquemático abaixo mostra uma secção transversa da medula espinal e do gânglio da raiz dorsal do nervo espinal (DRG). O DRG contém os neurônios sensoriais pseudounipolares. Os corpos celulares dos neurônios nociceptivos se localizam no DRG e são amplamente classificados nos tipos: grandes e pequenos. Os estudos de marcação imunistoquímica mostram que as fibras C de condução lenta e as fibras A δ têm corpos celulares de pequeno diâmetro, enquanto que as fibras A β com velocidade de condução mais rápida, possuem corpos celulares maiores. Fonte: Adaptada de Milligan e Watkins (2009).



2.3.2 Transdução sensorial

O neurônio nociceptivo possui uma região especializada, onde o receptor sensorial detecta o estímulo, o qual para os nociceptores é o estímulo nocivo (que ocasiona ou pode ocasionar uma lesão tecidual). Tal estímulo provoca uma alteração conformacional no receptor, o que dispara o processo de transdução levando a uma mudança do potencial de repouso de membrana na célula receptora. A alteração resultante neste potencial de repouso é denominada potencial de receptor (BRODIN; ERNBERG; OLGART, 2016).

Potencial de repouso de membrana é o potencial de membrana não alterado pela geração de potenciais de ação. O potencial de repouso tem um valor negativo, o que por convenção significa que há uma diferença de potencial elétrico, sendo que o interior da célula se encontra mais negativo. Por sua vez, o potencial de ação é uma

onda de descarga elétrica que percorre a membrana de uma célula. São essenciais para a vida porque transportam rapidamente informações entre e dentro dos tecidos. Eles podem ser gerados por muitos tipos de células, mas são utilizados mais intensamente pelo sistema nervoso (LUMPKIN; CATERINA, 2007).

No neurônio nociceptivo, a parte da célula onde a transdução sensorial ocorre, muitas vezes, é distante do terminal sináptico. Portanto, o potencial de receptor precisa ser convertido em uma série de potenciais de ação propagados, os quais, por sua vez, carregam a informação nociceptiva ao longo do axônio. Os nociceptores não estimulados disparam poucos potenciais de ação e a sua resposta ao estímulo nocivo é um aumento da taxa de disparo da propagação dos potenciais de ação no axônio, o que implica a necessidade de despolarização da membrana. Assim, a transdução sensorial é a conversão do estímulo nocivo em disparo padronizado de potenciais de ação (LUMPKIN; CATERINA, 2007; DUNNE *et al.*, 2018).

2.3.3 Canais iônicos

Os estímulos nociceptivos de origem mecânica, térmica ou química podem ativar diferentes receptores [por ex., um canal iônico, um receptor acoplado à proteína G (GPCR, do inglês, “G protein–coupled receptors”)] presentes nos terminais periféricos de fibras aferentes nociceptivas. A ativação destes receptores gera correntes despolarizantes que, dependendo da intensidade, iniciam os disparos dos potenciais de ação por ativação de canais iônicos específicos também presentes na membrana neuronal (Figura 2). Estes são os canais de íons controlados por voltagem (VGICs, do inglês, “Voltage-gated ion channels”) e dentre os mais ativamente envolvidos nos eventos elétricos nos neurônios temos os canais de sódio controlados por voltagem de subunidade alfa ($\text{NaV}\alpha$) e os canais de potássio controlados por voltagem (KV) (LUMPKIN; CATERINA, 2007; BELL, 2018).

Em resposta ao estímulo despolarizante, parte dos canais NaV se abrem permitindo o influxo de Na^+ , levando a membrana a atingir o seu limiar. A entrada de Na^+ causa a abertura de mais canais NaV e, assim, mais despolarização. Os canais NaV rapidamente assumem um estado fechado (estado inativo) e assim permanecem por alguns milissegundos antes de retornarem ao estado de repouso, quando podem novamente ser ativados. A partir disso, os canais KV se abrem, conduzindo a célula à repolarização. A hiperpolarização ocorre pelo fechamento lento desses canais, com

consequente retorno da membrana ao repouso. Dessa forma, os canais KV levam ao encerramento do potencial de ação (LUMPKIN; CATERINA, 2007; BELL, 2018).

2.3.4 Fibras nociceptivas

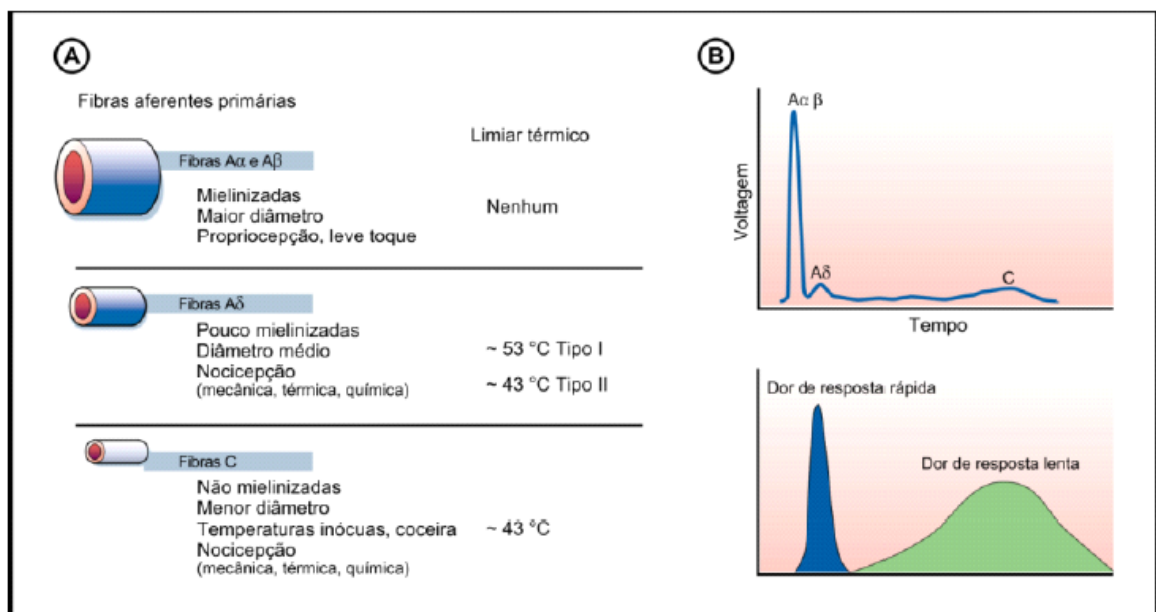
Os estímulos de natureza mecânica, térmica ou química são detectados por fibras aferentes primárias periféricas e transmitidos ao SNC através das mesmas, para o processamento da informação nociceptiva (DUNNE *et al.*, 2018).

As fibras sensoriais somáticas são provenientes de corpos celulares localizados no gânglio trigeminal (GT) ou no restante do GRD (gânglios espinais), innervando a região da cabeça ou do corpo, respectivamente (BASBAUM *et al.*, 2009). Já as fibras aferentes vagais, que innervam a maioria dos tecidos viscerais, possuem seus corpos celulares nos gânglios nodoso (GN) e jugular (GJ) (BLACKSHAW; BRIERLEY; HUGHES, 2010). As fibras sensoriais possuem tanto um ramo axônico periférico, innervando tecidos periféricos, quanto um ramo axônico central, fazendo a conexão com a medula espinal, e são classificadas em grupos, com base em critérios anatômicos e funcionais (BASBAUM *et al.*, 2009).

Dessa forma, fibras A α e A β representam os proprioceptores e receptores mecânicos de baixo limiar e são especializadas na condução do estímulo mecânico inócuo, apresentam velocidade de condução rápida e são particularmente abundantes na derme e epiderme. Por outro lado, algumas fibras com diâmetros menores (A δ e C) são terminações nervosas livres periféricas, mostram alto limiar de ativação e são responsáveis por detectar estímulos nocivos, ou seja, nocicepção (Figura 2) (JULIUS; BASBAUM, 2001; DAVIS *et al.*, 2017). Devido à diferença na velocidade de condução entre as fibras A δ e C, o sinal das fibras A δ chega à medula espinal antes do das fibras C, demonstrando que o estímulo doloroso evoca duas sensações de dor sucessivas e possivelmente distintas. Assim, fibras A δ são responsáveis pela detecção da dor rápida e aguda (“primeira dor”/dor em picada), enquanto que as fibras C são condutoras da dor lenta e difusa (“segunda dor”/dor em queimação) (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM *et al.*, 2009). Estudos de eletrofisiologia mostraram que as fibras A δ são subdivididas em dois grupos: Tipo I, as quais respondem tanto a estímulos químicos quanto mecânicos, com limiar de ativação térmico elevado (>50°C), e Tipo II, as quais apresentam menor limiar de ativação térmico (<43°C); porém, elevado limiar de ativação mecânica (BASBAUM *et al.*, 2009). As fibras C também apresentam heterogeneidade, podendo ser divididas em peptidérgicas (liberam glutamato, substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene

da calcitonina (CGRP) e expressam o receptor NK-1R (do inglês, “Neurokinin 1 receptor”) e não-peptidérgicas (expressam o receptor purinérgico P2X3, apresentam ligação para a isolectina B4) (CHAKRABORTY *et al.*, 2012; PETHO; REEH, 2012). É importante ressaltar que nem todas as fibras C são nociceptivas, algumas respondem à sensação de refrescância (*cooling*) e outras à inócua sensação do acariciar da pele. Estas últimas parecem mediar o toque prazeroso (OLAUSSEON *et al.*, 2010). Além da diferenciação anatômica, as fibras nociceptivas também diferem na expressão de receptores seletivos e canais iônicos, o que confere certa especificidade dos nociceptores a determinados estímulos (JULIUS; BASBAUM, 2001; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

Figura 2 - Fibras sensoriais aferentes primárias e suas características. Ilustração das fibras sensoriais e os diferentes tipos de estímulos conduzidos pelas fibras aferentes primárias. Enquanto as fibras mielinizadas e de maior diâmetro (fibras A α e A β) são responsáveis pela detecção de estímulos não nocivos, as fibras de menor diâmetro, pouco ou não mielinizadas (fibras A δ e C, respectivamente) são responsáveis pela detecção de estímulos nocivos (A). A velocidade de condução está relacionada ao diâmetro da fibra (B), sendo as fibras do tipo A δ responsáveis pela resposta rápida e as fibras do tipo C responsáveis pela resposta lenta. Fonte: Adaptado de Julius e Basbaum (2001).



2.3.5 Transmissão sensorial

Este processo é caracterizado pela transmissão dos potenciais de ação gerados na periferia até os centros superiores.

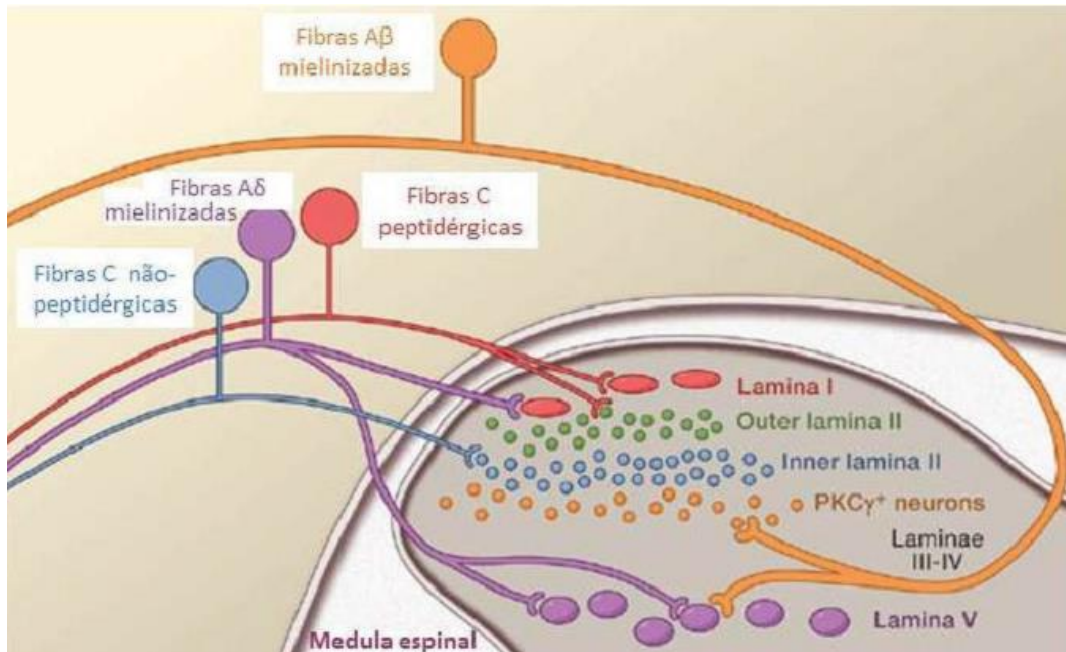
A organização arquitetônica da medula espinal permite distinguir anatomicamente as lâminas (lâminas de Rexed) onde cada tipo de fibra aferente

primária (oriunda da periferia) termina. As lâminas de I a VI fazem parte do corno dorsal (CD) da medula espinal, as lâminas VII a IX constituem o corno ventral da medula espinal e a lâmina X representa as células organizadas ao redor do canal central da medula espinal (MILLAN, 1999; BELL, 2018).

Na transmissão sensorial, as fibras aferentes primárias (ou neurônios aferentes primários) projetam-se ao corno dorsal da medula espinal (CDME) de maneira específica e organizada. O CDME possui uma organização laminar, sendo que cada lâmina é distinta anatômica e funcionalmente. As fibras A δ e C inserem-se nas camadas mais superficiais (lâminas I (marginal) e II (substância gelatinosa - SG), respectivamente) ou no caso das fibras A δ , também na lâmina V (em menor quantidade), enquanto as fibras responsáveis primariamente pelo tato e propriocepção (fibras A α e A β) inserem-se nas lâminas III – V, mais profundas (Figura 3) (BASBAUM *et al.*, 2009). A parte mais interna da lâmina II, onde se inserem as fibras C não-peptidérgicas, é caracterizada pela presença de interneurônios excitatórios que expressam a isoforma gama da proteína cinase C (PKC), envolvida na dor persistente induzida por lesões (PETHO; REEH, 2012). Neurônios que fazem sinapses na lâmina V são excitados por estímulos de intensidade variável e por isso, são denominados de neurônios de amplo espectro dinâmico (MILLAN, 2003).

O CDME funciona como uma estação de controle da transmissão nociceptiva. Nesta região, os neurônios sensoriais primários liberam mediadores, como glutamato, substância P e CGRP transmitindo o sinal nociceptivo a neurônios de segunda ordem (neurônios sensoriais secundários) que, por sua vez, formam vias ascendentes que transmitem a informação a centros supraespinais, como o tálamo e córtex, ocorrendo, assim, a interpretação e localização da dor (MILLAN, 2002). É interessante destacar que os neurônios de segunda e terceira ordem passam a ser do tipo unipolar (com seus corpos celulares no corno dorsal da medula e tálamo, respectivamente) e que a diferenciação em mielinizado/não mielinizado e fibras C/A δ é somente na periferia. A partir dos neurônios de segunda ordem, todas as fibras são mielinizadas (que se originam na forma de tratos), projetam-se contíguas às fibras periféricas com que fizeram sinapse (BASBAUM *et al.*, 2009).

Figura 3 - Representação esquemática da inserção das fibras sensoriais aferentes primárias no corno dorsal da medula espinal. Organização laminar do corno dorsal da medula espinal. Fibras nociceptivas A δ e C terminam mais superficialmente (lâminas I e II), onde fazem sinapses com neurônios de segunda ordem, sendo que as fibras A δ também se projetam para a lâmina V. As fibras não-nociceptivas (fibras A β) projetam-se para as camadas intermediárias, representadas pelas lâminas III – V. Fonte: Adaptado de BASBAUM *et al.*, 2009.



2.3.5.1 Vias da transmissão nociceptiva

A partir da transmissão da informação nociceptiva ao neurônio de segunda ordem, esta acenderá para múltiplas áreas supraespinais através de tratos neuronais específicos (vias de projeção da dor ou sistema anterolateral). As principais vias de condução da nocicepção no SNC são o *trato neoespinotalâmico*, *trato espinorreticular* e o *trato espinolímbico* (trato *paleoespinotalâmico*) (Figura 4).

Os tratos espinotalâmicos transmite informações da medula espinal para o tálamo sobre dor, temperatura, pressão e tato. Cursam lateralmente no tronco encefálico, enviam projeções ao núcleo ventral póstero-lateral do tálamo dorsal projetando-se para o córtex somatosensorial. São divididos em neoespinotalâmico e paleoespinotalâmico (WILLIS; WESTLUND, 1997; MILLAN, 1999).

A via neoespinotalâmica é a via clássica da dor. Transmite a dor rápida, formada por fibras contíguas às fibras A δ , chega a pontos específicos do tálamo e filogeneticamente é a via mais evoluída. O glutamato é o principal neurotransmissor. A sensação dolorosa percebida por esta via é epicrítica, ou seja, é precisa, bem definida, bem localizada, intensificada e discriminada. Possui poucas estações

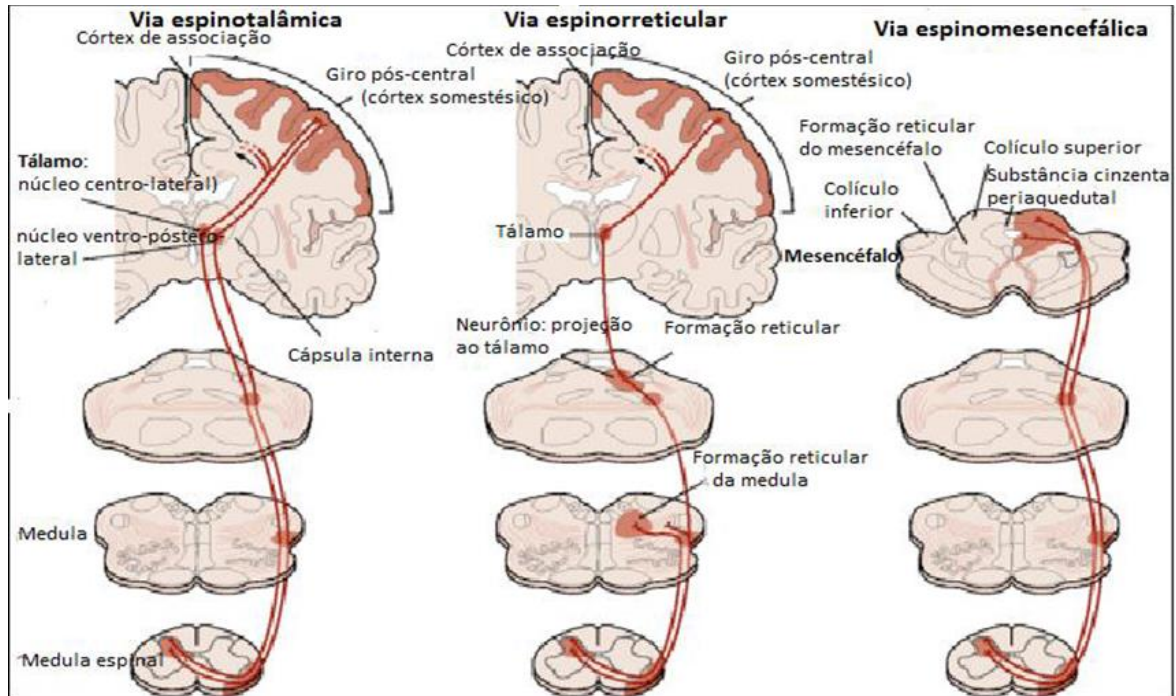
sinápticas e se projeta no núcleo ventral póstero-lateral do tálamo, cujos neurônios recebem o nome de terciários (neurônios de terceira ordem), os quais projetam-se para o córtex somatossensorial, onde ocorre o processamento da informação nociceptiva (OLIVERAS; BESSON, 1988; WILLIS; WESTLUND, 1997).

A via paleoespinotalâmica é a via que transmite a dor lenta, formada por fibras contíguas às fibras C e possui várias estações sinápticas. Nesta via há envolvimento de glutamato, SP e CGRP. A informação é gradativa, prolongada e muito difusa. Uma parte das fibras vai ao tálamo e deste ao córtex somestésico, mas a maioria se dirige à formação reticular mesencefálica e, a partir destas áreas, a informação é enviada para o córtex límbico e frontal, hipotálamo e núcleos motores. O sistema límbico é responsável pela resposta de alerta e fuga e respostas emocionais desagradáveis ao estímulo doloroso (WILLIS, 1985; MELZACK, 1999). Esse tipo de dor não consegue ser analisada com precisão, nem sua localização, intensidade e características, uma vez que a sensação dolorosa percebida por esta via é protopática (primitiva, sem refinamento) (WILLIS, 1985).

O trato espinorreticular é anatomicamente menos individualizado. Os neurônios deste trato se originam da lâmina V e sobem no quadrante contralateral conjuntamente com fibras do trato paleoespinotalâmico. Este trato representa um papel importante na sensação da dor, especialmente na dor crônica profunda. Cursa medialmente no tronco encefálico e está ligado ao Sistema Reticular Ativador Ascendente (SARA) e a Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG, do inglês, “periaquedutal gray matter”). Envia projeções difusas para o tálamo, córtex somestésico e estruturas do sistema límbico (MILLAN, 2002).

O trato espinolímbico (trato paleoespinotalâmico) é também uma via cruzada que ascende em associação com o trato espinotalâmico, conduzindo informação nociceptiva. A informação é transmitida ao córtex insular e cingulado, através da amígdala, contribuindo para o componente emocional da percepção da dor (BASBAUM *et al.*, 2009).

Figura 4 - Três das principais vias ascendentes que transmitem a informação nociceptiva a partir da medula espinal aos centros superiores. Os tratos espinotalâmicos são a mais proeminente via nociceptiva ascendente na medula espinal. A informação nociceptiva ascende por um ou por uma combinação desses tratos. Fonte: Adaptado de Kandel, Schwartz, Jessell, 2000.



2.3.6 Percepção e processamento da dor

O tálamo desempenha um papel fundamental na integração do impulso doloroso. É nele que ocorre a percepção da informação dolorosa; porém, não há processamento para indicar as características desse estímulo nociceptivo, ou seja, é uma percepção vaga. A partir do tálamo, neurônios de terceira ordem transmitem impulsos para o córtex somatossensorial e cingular. No córtex somatossensorial ocorre o processamento que resulta em consciência da dor (WILLIS; WESTLUND, 1997) e no córtex cingular é processada a qualidade emocional ou afetiva da dor, enviando impulsos de volta para o córtex somatossensorial. Neste processo originam-se qualidades mais precisas, como tipo de dor, localização e ansiedade emocional. Dessa maneira, a informação nociceptiva alcança as áreas sensoriais do córtex somestésico, onde aspectos como qualidade, intensidade, localização e duração do estímulo nociceptivo serão integrados e componentes afetivos e emocionais serão interpretados e contextualizados, levando à percepção consciente e discriminada do estímulo nociceptivo (WILLIS; WESTLUND, 1997; MILLAN, 1999).

2.4 Sensibilização periférica

Como supracitado, a dor pode ter origem frente à um estímulo nocivo; porém, muitas vezes tal estímulo provoca uma lesão tecidual seguida de um processo inflamatório, o qual normalmente desaparece quando há o controle ou a resolução da inflamação. Uma vez instalado, promove a estimulação constante dos nociceptores levando a alterações neuroplásticas no SNC e sistema nervoso periférico (SNP) conduzindo à manutenção do estado álgico, chamado de sensibilização periférica (CAO; ZHANG, 2008; VOSCOPOULOS; LEMA, 2010).

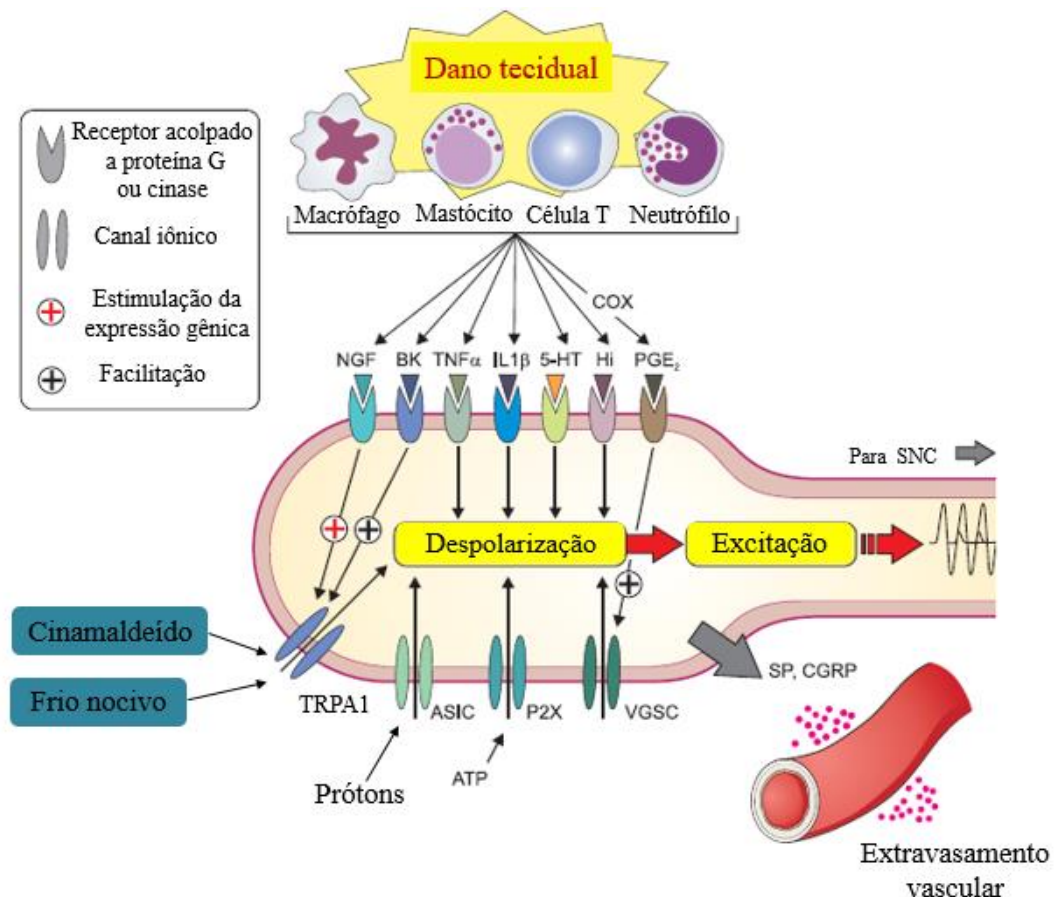
A sensibilização periférica é o processo pelo qual o nociceptor devido a uma mudança no meio químico reduz seu limiar de ativação e aumenta a responsividade. Isso leva ao aumento da sensibilidade à dor (hiperalgesia) (WOOLF, 2010; BRODIN; ERNBERG; OLGART, 2016). Durante o trauma tecidual, os mediadores inflamatórios são liberados devido à ruptura das células, mas também pela desgranulação de mastócitos e ativação de plaquetas, macrófagos e células imunológicas, formando a chamada “sopa inflamatória” (Figura 5) (RICHARDSON; VASKO, 2002; BRODIN; ERNBERG; OLGART, 2016). Ligando-se a seus respectivos receptores, uma cascata de eventos é iniciada. Os primeiros passos neste processo incluem a ativação de múltiplas vias de transdução de sinal intracelular nos neurônios aferentes primários. Estes incluem as proteínas-cinases A (PKA) e C (PKC) e as proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK) ERK e p38 (MILLIGAN; WATKINS, 2009; BRODIN; ERNBERG; OLGART, 2016). A ativação destas vias leva a várias regulações gênicas nos núcleos das células dos neurônios aferentes nos gânglios da raiz do nervo trigêmeo e da raiz do nevo espinal dorsal, incluindo transcrição aumentada (produção de "RNA-copies") dos genes que codificam TRPs (por exemplo, TRPA1) e canais iônicos controlados por voltagem (VGICs), e para aumentar a síntese dos canais via tradução (síntese de proteínas usando RNA como modelo) (WANG *et al.*, 2008; MEENTS; FISCHER; MCNAUGHTON, 2017; SOUSA-VALENTE; BRAIN, 2018). Os canais são; então, transportados para a membrana celular do neurônio aferente primário (tráfego de proteínas) onde são fosforilados, levando a um menor limiar de ativação dos canais e sensibilização do nociceptor (hiperalgesia primária) (GUILLOT *et al.*, 2012; ANDERSEN; GAZERANI; ARENDT-NIELSEN, 2016; PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2018).

É importante lembrar que a inflamação neurogênica (resultado da ativação periférica dos neurônios aferentes sensoriais liberando mediadores inflamatórios)

resulta da estimulação antidrômica. Esta se caracteriza pela condução dos potenciais de ação em sentido oposto ao normal (ortodrômica), os quais são conduzidos através das ramificações terminais do nociceptor. A inflamação neurogênica, como vimos, amplifica e sustenta a reação inflamatória e a ativação de fibras aferentes nociceptivas que a acompanha. A despolarização do terminal periférico do neurônio aferente primário leva à liberação dos neuropeptídios – SP e CGRP – que, por sua vez, atuam em células alvo na periferia, como os mastócitos e o músculo liso vascular, produzindo a inflamação caracterizada pelo eritema, rubor e edema (RICHARDSON; VASKO, 2002; GRACE; ROLAN; HUTCHINSON, 2011; BRODIN; ERNBERG; OLGART, 2016).

Dessa forma, uma das metas na investigação da dor é identificar os mediadores químicos que são liberados nos tecidos lesados e responsáveis pela ativação direta ou sensibilização dos nociceptores, favorecendo o aparecimento da hipersensibilidade, assim como novas terapias que sejam capazes em inibir sua síntese, liberação ou ligação em seus receptores.

Figura 5 - Mecanismos envolvidos na sensibilização periférica durante a inflamação. Ativação de várias células especializadas, incluindo macrófagos, mastócitos, células T, neutrófilos e outras células imunológicas. Os mediadores liberados incluem prótons (H⁺), purinas (por exemplo, trifosfato de adenosina, ATP), fator de crescimento nervoso (NGF), bradicinina (BK), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas (por exemplo, IL-1), serotonina (5 hidroxitriptamina, 5-HT), histamina (Hi) e prostaglandinas (por exemplo, PGE₂). As prostaglandinas são formadas por enzimas ciclo-oxigenase (COX). Juntos, esses (e outros) mediadores formam a «sopa inflamatória» que contribui para maior sensibilidade dos nociceptores periféricos por meio do acoplamento a canais iônicos ligados à membrana (incluindo os receptores de potencial transitório (TRP) (ex: TRPA1), canais iônicos sensíveis ao ácido (receptores ASICs) e purinérgicos (P2X) e receptores ligados à quinase (por exemplo, receptores de NGF, TNF e IL-1) e receptores acoplados à proteína G (por exemplo, receptores de bradicinina-2 e prostaglandina). No conjunto, esses mecanismos podem levar à despolarização e excitação do neurônio, bem como à alteração de longo prazo da regulação gênica (por exemplo, NGF e bradicinina aumentando a expressão de TRPA1 e prostaglandinas aumentando a expressão de canais de sódio dependentes de voltagem (VGSC). Os próprios terminais podem liberar a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), que causam vasodilatação e extravasamento plasmático (inflamação neurogênica). Fonte: Adaptado de BRODIN, ERNBERG e OLGART, 2016.



2.5 Dor aguda

Em 1996, a “American Pain Society” introduziu o conceito de dor como o quinto sinal vital, ressaltando o papel significativo da dor no estado fisiológico de um paciente. Alguns anos mais tarde, a Comissão Conjunta de Acreditação de Organizações de Saúde recomendou avaliação da dor em todos os pacientes (“The Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations”, 2001).

Em 2001, a Câmara dos Representantes dos EUA destacou ainda mais a questão iniciando a Década de Controle e Pesquisa da Dor (2001-2010). Um relatório de referência em 2011 do Instituto de Medicina também destacou a necessidade de mudança na avaliação e tratamento da dor por programas federais de assistência médica e financeira. Em resposta a essas iniciativas, os médicos começaram a incorporar a avaliação da dor na prática rotineira. Apesar dos esforços para aumentar a consciência, a dor inadequadamente gerenciada é um problema persistente (RADNOVICH *et al.*, 2015; TEDORE *et al.*, 2015).

A dor aguda consiste em uma cadeia de eventos que começa com estímulos (por exemplo, altas temperaturas, pressão ou produtos químicos) que ativam terminações nervosas especializadas em reconhecer estímulos de origem diversas nas fibras nervosas sensoriais periféricas. Após essa ativação, impulsos excitatórios transportados pelos axônios aferentes sensoriais induzem potenciais pós-sinápticos excitatórios em neurônios de transmissão de dor localizados no corno dorsal da medula espinhal, com o relé sináptico final ocorrendo no córtex cerebral (WOOLF, 2010; BELL, 2018) (Figura 1).

A transição da dor aguda para dor crônica é um processo mal entendido e pode variar com base em fatores fisiológicos, psicológicos, sociais e ocupacionais. As alterações fisiológicas parecem envolver componentes periféricos e centrais do sistema nervoso (RADNOVICH *et al.*, 2015; TEDORE *et al.*, 2015). Portanto, uma compreensão mais detalhada do gerenciamento da dor aguda pode resultar em uma estratégia eficaz para prevenir o desenvolvimento de dor crônica.

2.6 Mecanismos centrais do controle da dor

Sabe-se que as sensações de dor podem ser modificadas por sistemas descendentes inibitórios endógenos, como, por exemplo, os sistemas noradrenérgico, serotoninérgico, opioide, dopaminérgico e canabinoide, via liberação de substâncias como noradrenalina (NA), serotonina (5 hidroxitriptamina, 5-HT) opioides, dopamina (DA) e canabinoides endógenos, respectivamente. O mecanismo descendente pode

modular a nocicepção por interação com vários elementos neuronais no corno dorsal da medula espinal: (1) os próprios terminais das fibras aferentes primárias, (2) neurônios de projeção, (3) interneurônios excitatórios ou inibitórios e (4) terminais de outras vias descendentes. Os mecanismos que medeiam o controle descendente inibitório atenuam a liberação de mediadores pró-nociceptivos (ações pré-sinápticas) e, direta ou indiretamente (via interneurônios inibitórios), suprimem a excitação dos neurônios de projeção (ações pós-sinápticas) (MILLAN, 1999, 2002).

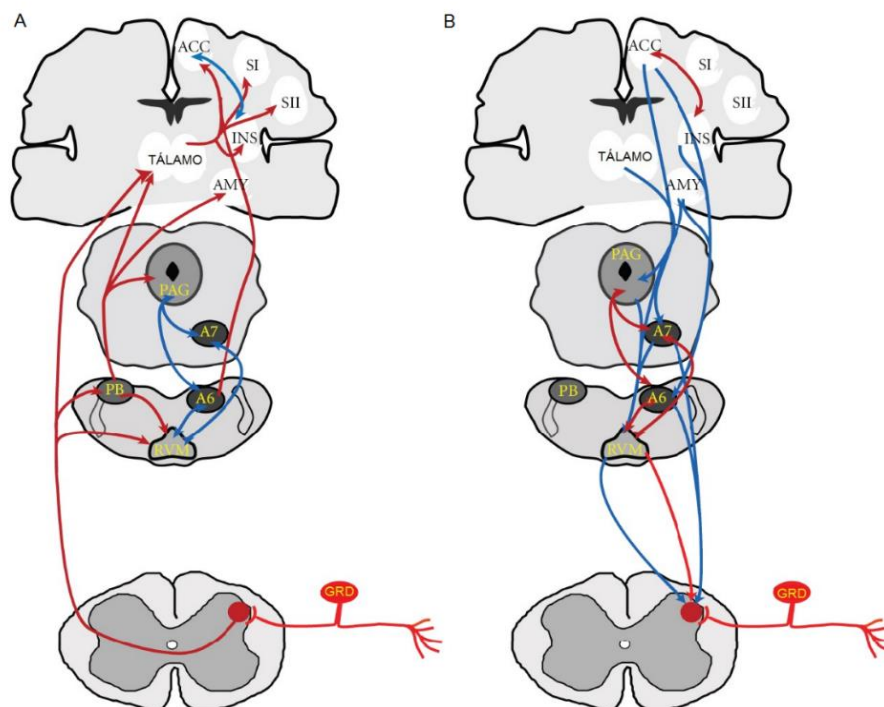
A modulação (facilitação ou inibição) da dor existe na forma de um circuito modulatório, com aferências em múltiplas áreas, incluindo o hipotálamo, o complexo amigdalóide, o córtex cingulado anterior rostral (rACC), se dirige para a região da PAG, e com eferências da PAG para o bulbo. Os neurônios que se localizam no núcleo magno da rafe e no núcleo reticular gigantocelular, que estão incluídos no bulbo ventromedial rostral (RVM, do inglês, “rostral ventromedial medula”), projetam-se para a medula espinal (corno dorsal) para, direta ou indiretamente, aumentar ou diminuir o tráfego nociceptivo, modificando a experiência da dor (Figura 7) (OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

No corno dorsal da medula espinal, os sinais nociceptivos podem ser inibidos por meio de interneurônios que liberam o ácido γ -aminobutírico (GABA), glicina ou opioides, modulando a transmissão em neurônios de projeção espinotalâmicos e espinobulbares (MILLAN, 2002). Outro importante modulador endógeno no processamento sensorial é a acetilcolina (ACh), especialmente em nível espinal, controla criticamente a primeira sinapse da via nociceptiva ascendente (GODIN *et al.*, 2011). Foi demonstrado que seus interneurônios no corno dorsal da medula espinal são de fato uma população celular rara e esparsa, mas com dendritos e axônios altamente alongados na direção rostro-caudal. Da mesma forma, resultados experimentais indicam que, por meio de sua ação nos receptores colinérgicos da medula espinal, a ACh endógena participa do ajuste dos limiares nociceptivos e do efeito de analgésicos clinicamente relevantes (OBATA, 2017).

Além disso, sistemas descendentes originários do tronco encefálico, de estruturas que incluem a PAG, o “locus coeruleus”, o RVM e o tegmento pontino dorsolateral exercem inibição dos estímulos nociceptivos na medula espinal (HEINRICHER *et al.*, 2009). Anatomicamente, a PAG, que expressa grande

quantidade de encefalinas e receptores opioides, envia projeções para o RVM, especialmente para a porção do núcleo magno da rafe (RMg, do inglês, “raphe magnus nucleus”) e núcleos adjacentes, bem como para “locus coeruleus”, nos núcleos A6 e A7 noradrenérgicos, que também fazem comunicação direta ou indireta com o RVM. O RVM e os núcleos A6 e A7 se projetam para a medula espinal e modulam a atividade de neurônios do corno dorsal e, por fim, a informação nociceptiva, por meio de fibras serotoninérgicas e noradrenérgicas (LLORCA-TORRALBA *et al.*, 2016; AL-HASANI; BRUCHAS, 2018). Outra fonte importante de controle descendente são os neurônios A11 do hipotálamo periventricular posterior de inervação dopaminérgica do corno dorsal da medula espinal. Ambos os estímulos nocivos agudos e sustentados aumentam o *turnover* da dopamina no corno dorsal da medula espinal, sugerindo um aumento da atividade da via dopaminérgica descendente (MILLAN, 2002; BENARROCH, 2008). É sabido que existe um balanço entre a facilitação e a inibição da dor através das vias ascendentes e descendentes (OSSIPOV, 2012). Este balanço é alterado após lesões teciduais de uma maneira dependente do tempo, a qual pode resultar em aumento da facilitação ou da inibição da dor (BENARROCH, 2008; BASBAUM *et al.*, 2009).

Figura 6 - Os principais sistemas modulatórios ascendente (a) e descendente (b). Legenda: Os “inputs” nociceptivos entram no SNC pelo corno dorsal da medula espinal onde os terminais dos neurônios aferentes primários fazem sinapse com os neurônios de projeção de segunda ordem. O trato ascendente (A) é representado em vermelho e as setas em azul representam as comunicações bilaterais. A projeção descendente (B) é mostrada em azul e as setas em vermelho indicam as comunicações bilaterais. As projeções em vermelho e azul do RVM para a medula espinal sugerem a facilitação descendente e a inibição descendente, respectivamente. As regiões ilustradas são os núcleos A6 e A7 noradrenérgicos, ACC: córtex cingulado anterior; AMY: amígdala; GRD: gânglio da raiz dorsal do nervo espinal; INS: córtex insular; PAG: substância cinzenta periaquedutal; PB: núcleo parabraquial; RVM: bulbo rostroventromedial; SI: córtex sensorial primário; SII: córtex somatossensorial secundário. *Fonte:* Adaptado de Ossipov (2012).



Os aminoácidos aromáticos hidroxilases tirosina hidroxilase (TH), dopamina hidroxilase (D β H) e triptofano hidroxilase (TPH) catalisam as etapas da taxa na biossíntese de monoaminas (DA e NA) e da indolamina (5-HT) (ZHANG *et al.*, 2012; WALØEN *et al.*, 2017). A monoamina NA e a indolamina 5-HT são os neurotransmissores principalmente envolvidos na via moduladora da dor do controle descendente (KWON *et al.*, 2000; NAKAMOTO *et al.*, 2015; BANNISTER; DICKENSON, 2017). Em relação à NA, recentemente, métodos imunistoquímicos, revelaram a expressão desses marcadores, tirosina hidroxilase (TH; a enzima limitadora da taxa na biossíntese da catecolamina) e/ou a dopamina- β -hidroxilase (D β H; a enzima final na biossíntese da noradrenalina), não apenas dentro dos

neurônios do “locus coeruleus” (LI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2012), mas também em fibras/axônios noradrenérgicos na medula espinal (HOU *et al.*, 2016).

Os neurônios noradrenérgicos do “locus coeruleus” são bem conhecidos por expressar imunorreatividade à tirosina hidroxilase (TH) (WALØEN *et al.*, 2017). No entanto, devido à sua atividade enzimática muito baixa, as fibras corticais com NE normalmente não expressam a imunorreatividade à TH, portanto a imunorreatividade da D β H é comumente utilizada como um marcador para as fibras corticais do NE (FAN *et al.*, 2013; NAKAMOTO *et al.*, 2015; OHKUBO *et al.*, 2019). Por outro lado, uma vez que a TH é a primeira enzima nas vias sintéticas das catecolaminas, tem sido comumente utilizado para identificar neurônios noradrenérgicos no LC e dopaminérgicos na substância negra e na área tegmental ventral (VTA, do inglês, “ventral tegmental área”) (ZHANG *et al.*, 2012).

Os TPHs são responsáveis pela conversão catalítica do L-triptofano em 5-HT, que é um precursor da serotonina. Sabe-se que a expressão de TPH é um marcador enzimático de neurônios serotoninérgicos em regiões como o núcleo dorsal da rafe (DRN, do inglês, “dorsal raphe nucleus”) e RMg (MORGADO *et al.*, 2011; WALØEN *et al.*, 2017; COSTA-PEREIRA *et al.*, 2019), assim como na medula espinal (ZHANG, 2016). O RVM é a principal estação de retransmissão usada pela PAG na transmissão da modulação da dor a partir de centros cerebrais mais elevados, como a amígdala e o córtex cingulado anterior (HEINRICHER *et al.*, 2009). Dessa forma, atividades metabólicas de enzimas citosólicas, como, TH, D β H e TPH, influenciam indiretamente a transmissão monoaminérgica e, sendo assim, importantes marcadores para detectar alterações que afetam esta transmissão.

2.7 Fotobiomodulação (FBM)

O termo fotobiomodulação (PBM, do inglês, “photobiomodulation”), diz respeito à intervenção terapêutica não invasiva com luz, realizadas com diodos de LED (do inglês, “Diode emitting Light”); Diodos Emissores de Luz ou LASER (do inglês, “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”; Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação). Os benefícios da luz solar no tratamento de doenças de pele foram explorados por mais de milhares de anos no antigo Egito, na Índia e na China (BAROLET, 2008). Porém, anos mais tarde a terapia solar foi redescoberta por Niels Ryberg Finsen, um médico e cientista dinamarquês que ganhou, em 1903, o

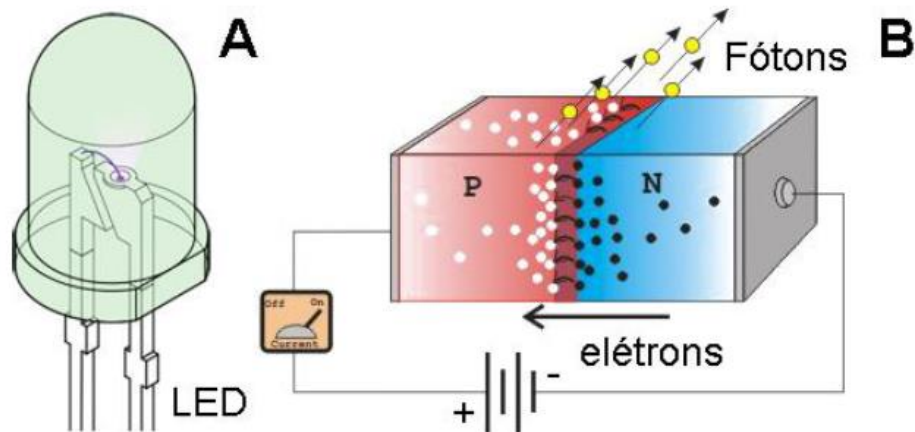
Prêmio Nobel de Medicina em reconhecimento a sua contribuição para o tratamento de doenças, especialmente o lúpus vulgar (ROELANDTS, 2005).

No final dos anos 60, Endre Mester, um médico húngaro, iniciou uma série de experimentos sobre o potencial carcinogênico de lasers usando um laser de rubi de baixa potência (694nm) em camundongos. Para sua surpresa, o laser não causou câncer, mas melhorou o crescimento do cabelo que foi raspado nas costas do animal para o propósito do experimento. Esta foi a primeira demonstração de fotobiomodulação com terapia a laser de baixa intensidade (LLLT, do inglês, “Low-Level Laser Therapy”), abrindo, assim, um novo caminho para a ciência médica. Esta observação casual levou-o a realizar outros estudos fornecendo suporte para a eficácia da luz vermelha na cicatrização de feridas. Desde então, o tratamento médico com fontes coerentes (lasers) e luz não-coerente (diodos emissores de luz, LEDs) expandiu-se (BAROLET, 2008).

O trabalho inicial nesta área foi desenvolvido principalmente pela “National Aeronautics and Space Administration” (NASA). A pesquisa da NASA surgiu como resultado dos efeitos observados quando a luz de um comprimento de onda específico mostrou acelerar o crescimento das plantas. Por causa do nível deficiente de cicatrização de feridas experimentado pelos astronautas em condições de gravidade zero e Navy Seals em submarinos sob alta pressão atmosférica, a NASA investigou o uso de terapia com LEDs na cicatrização de feridas e obteve resultados positivos (BAROLET, 2008).

A terapia com diodos emissores de luz (LEDT), (do inglês, “Light emitting diode therapy”) é uma terapia de luz na qual utiliza como fonte de luz os LEDs, os quais são baseados na tecnologia de semicondutores (junções P-N), que sob fortes condições de polarização emitem luz (Figura 7) (SCHUBERT, 2006).

Figura 7 - LED e Junção P-N. (A) LED; (B) Junção P-N. Caracterizada pela junção de um semicondutor do tipo P (com cargas elétricas positivas) e de um semicondutor tipo N (com cargas elétricas negativas). A aplicação de tensão suficiente induz recombinações entre lacunas (P) e elétrons (N). Em cada recombinação um quantum de energia eletromagnética é liberado sob a forma de um fóton de luz. Adaptado de Schubert (2006).



2.7.1 Parâmetros

A “Lei de Arndt-Schulz” é frequentemente citada como um modelo adequado para descrever os efeitos dependentes da dose a FBM, demonstra uma resposta bifásica, as vezes trifásica da FBM. Ela afirma que estímulos fracos aceleram ligeiramente a atividade vital, estímulos mais fortes elevam ainda mais, mas atinge um pico e estímulos ainda mais fortes o suprimem, até que uma resposta negativa seja finalmente alcançada (MARTIUS, 1923).

Em fototerapia, a correta escolha dos parâmetros de irradiação, que envolvem a seleção do comprimento de onda adequado, e a dosimetria são essenciais para a obtenção do efeito terapêutico (ENWEMEKA, 2009; JENKINS; CARROLL, 2011). Os principais parâmetros são (Tabela 1):

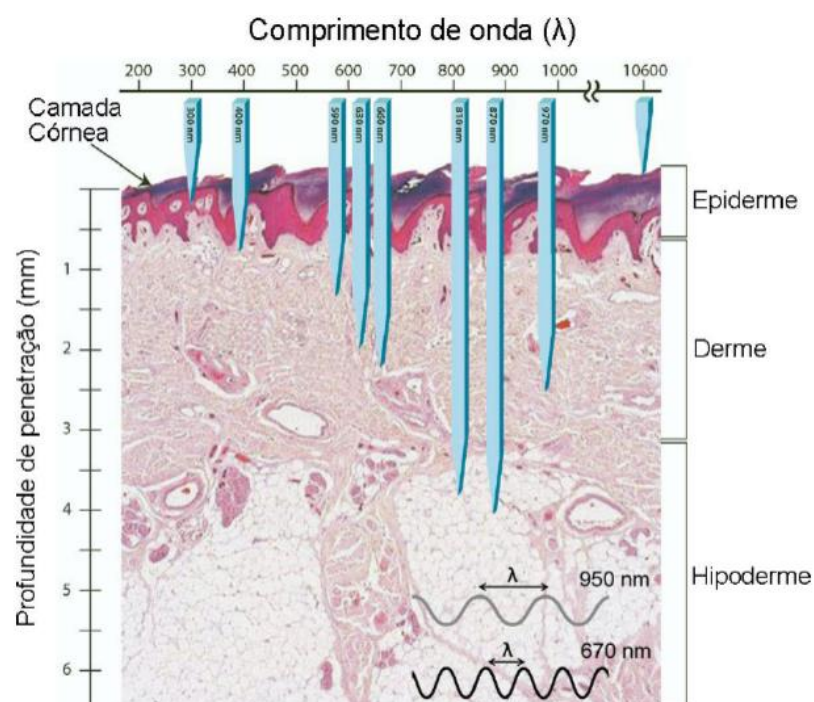
Tabela 1. Parâmetros envolvidos na determinação da fototerapia. Adaptado de Huang *et al.*, 2009.

	Parâmetros de irradiação	
Parâmetro de Irradiação	Unidade de medida	Conceito
Comprimento de onda	nm	A luz é energia eletromagnética que viaja em pacotes discretos que também têm uma propriedade parecida com uma onda
Irradiância	W/cm ²	Irradiância = Potência (W)/Área (cm ²)
Estrutura de pulso	Potência de pico (W) Frequência de pulso (Hz) Duração de pulso (s) Ciclo de trabalho (%)	Potência Média (W) = Potência de pico (W) x Duração (s) de Pulso x frequência de pulso (Hz)
Coerência	Depende da largura de banda espectral	Interação da fotobiomodulação com células e organelas subcelulares
Polarização	Polarizada linear ou polarizada circular	É rapidamente misturada em meios altamente dispersivos, como o tecido
Energia	Joules	Energia (J) = Potência (W) x Tempo (s)
Densidade de energia	J/cm ²	Normalmente chamada de dose. Densidade de energia (H) = Potência (W) x Tempo (s)/Área (cm ²).
Tempo de irradiação	s	Antes de definir o tempo, deve-se definir a potência, irradiância, área e o comprimento de onda
Intervalo de tratamento	Horas, dia ou semanas	Os efeitos de diferentes intervalos de tratamento são pouco explorados neste momento, embora haja evidências suficientes para sugerir que este é um parâmetro importante.

2.7.2 Mecanismo de ação

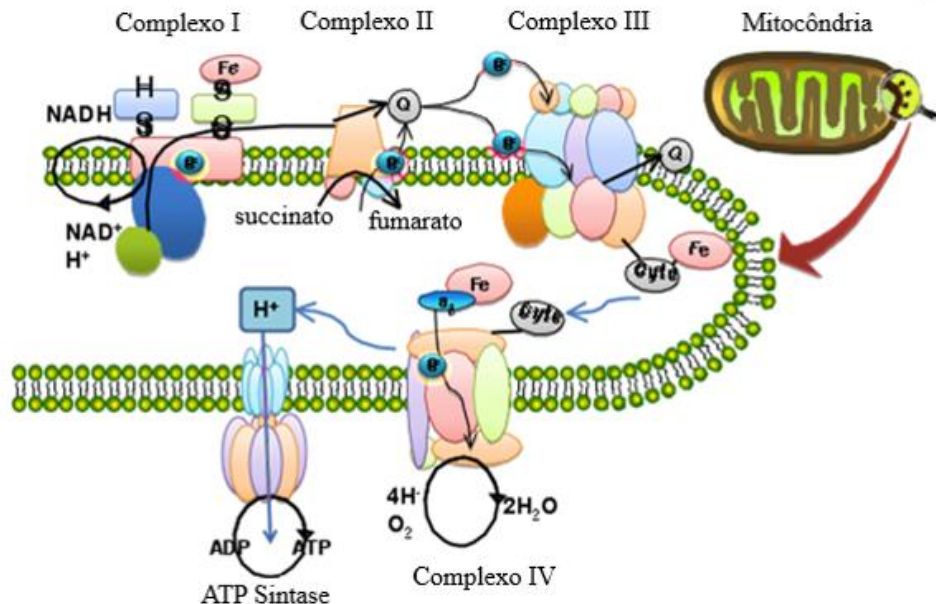
A primeira lei da fotobiologia afirma que para a luz visível de baixa potência tem algum efeito em um sistema biológico vivo, os fótons devem ser absorvidos por bandas de absorção eletrônicas pertencentes a algum cromóforo molecular ou fotoceptor (SUTHERLAND, 2002). A fotorresposta biológica se dá em função do comprimento de onda, número de ondas, frequência ou energia dos fótons e deve assemelhar-se ao espectro de absorção da molécula fotoceptora. O fato de um espectro de ação estruturado poder ser construído sustenta a hipótese da existência de fotoceptores celulares e vias de sinalização estimuladas pela luz (HAMBLIN; DEMIDOVA, 2006). A segunda consideração importante envolve as propriedades ópticas do tecido, pois, tanto a absorção como o espalhamento da luz no tecido são dependentes do comprimento de onda e os principais cromóforos teciduais (hemoglobina e melanina) têm bandas de absorção elevadas em comprimentos de onda inferiores a 600nm. Por estas razões, existe uma chamada “janela óptica” nos tecidos que cobrem os comprimentos de onda vermelhos e infravermelhos próximos, onde a efetiva penetração tecidual da luz é maximizada (Figura 8) (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016).

Figura 8 – Profundidade de penetração na pele para diferentes comprimentos de onda (λ). Estudos indicam que a radiação vermelha e infravermelha penetra nos tecidos biológicos com menor perda, atingindo estruturas mais profundas, fato que delimita uma importante “janela terapêutica”, entre cerca de 600nm e 1000nm. Adaptado de Barolet, 2008.



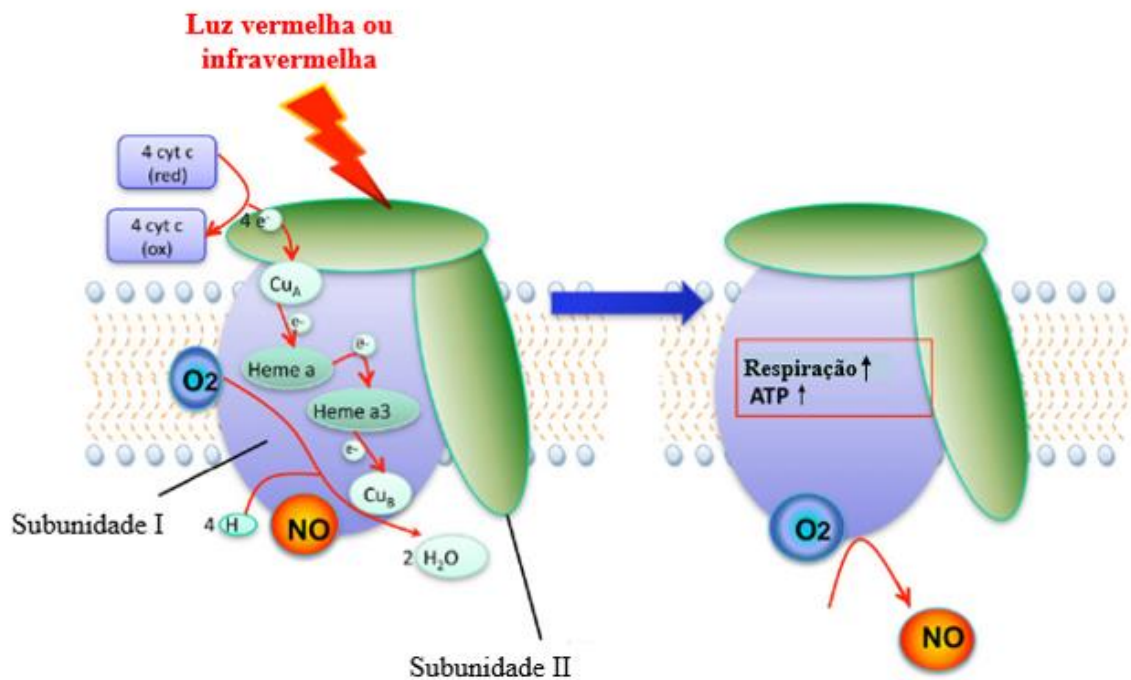
Foi sugerido em 1989 que o mecanismo da fotobiomodulação em nível celular foi baseado na absorção da radiação monocromática visível e NIR (do inglês, “near-infrared”) por componentes da cadeia respiratória celular (KARU, 1989). A membrana mitocondrial interna contém 5 complexos de proteínas integrais de membrana: NADH desidrogenase (Complexo I), succinato desidrogenase (Complexo II), citocromo c redutase (Complexo III), citocromo c oxidase (Complexo IV), ATP sintase (Complexo V) e duas moléculas livremente difusíveis, a ubiquinona e o citocromo c que transportam elétrons de um complexo para o outro (Figura 9). A cadeia respiratória realiza a transferência gradual de elétrons de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH, do inglês, “nicotinamide adenine dinucleotide”) e dinucleótido de adenina flavina (FADH₂, do inglês, “Flavin-Adenine Dinucleotide”) (produzidos no ciclo de Krebs) para moléculas de oxigênio para formar (com a ajuda de prótons) moléculas de água aproveitando a energia liberada por essa transferência para o bombeamento de prótons (H⁺) da matriz para o espaço intermembranar (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004; KARU *et al.*, 2008). O gradiente de prótons formado através da membrana interna por esse processo de transporte ativo forma uma “pequena bateria”. Os prótons podem fluir de volta para baixo neste gradiente, reentrando na matriz, somente através de outro complexo de proteínas integrais na membrana interna, o complexo da ATP sintase (HUANG *et al.*, 2009).

Figura 9 - Cadeia respiratória mitocondrial que consiste contém cinco complexos de proteínas integrais de membrana: NADH desidrogenase (Complexo I), succinato desidrogenase (Complexo II), citocromo c redutase (Complexo III), citocromo c oxidase (Complexo IV) e ATP sintase (Complexo V). Adaptado de Huang *et al.*, 2009.



A teoria mais aceita para explicar exatamente por que a absorção de fótons por CCO poderia levar ao aumento da atividade enzimática, aumento do consumo de oxigênio e aumento da produção de ATP é baseada na fotodissociação de óxido nítrico inibitório (NO) (YU *et al.*, 1997; KARU, PYATIBRAT, AFANASYEVA, 2005). Como o NO é ligado não covalentemente aos centros heme e Cu e bloqueia competitivamente o oxigênio, um fóton de energia relativamente baixo pode dissociar o NO e permitir que a respiração ocorra (KARU; PYATIBRAT; AFANASYEVA, 2005; HAMBLIN, 2018) (Figura 10).

Figura 10 - Fotodissociação proposta do NO a partir da citocromo c oxidase (CCO). A CCO é uma enzima com múltiplas subunidades contendo dois cofatores heme e dois centros de cobre que oxidam quatro moléculas do citocromo c reduzidas, enquanto, ao mesmo tempo, reduz o oxigênio à água e produz quatro prótons que formam o ATP via ATP sintase. O óxido nítrico pode inibir este processo ligando-se à CuB, e propõe-se que a luz vermelha ou infravermelha possa dissociar este NO não covalentemente ligado, aumentando a taxa de respiração e a produção de ATP. Adaptado de Hamblin, 2018.

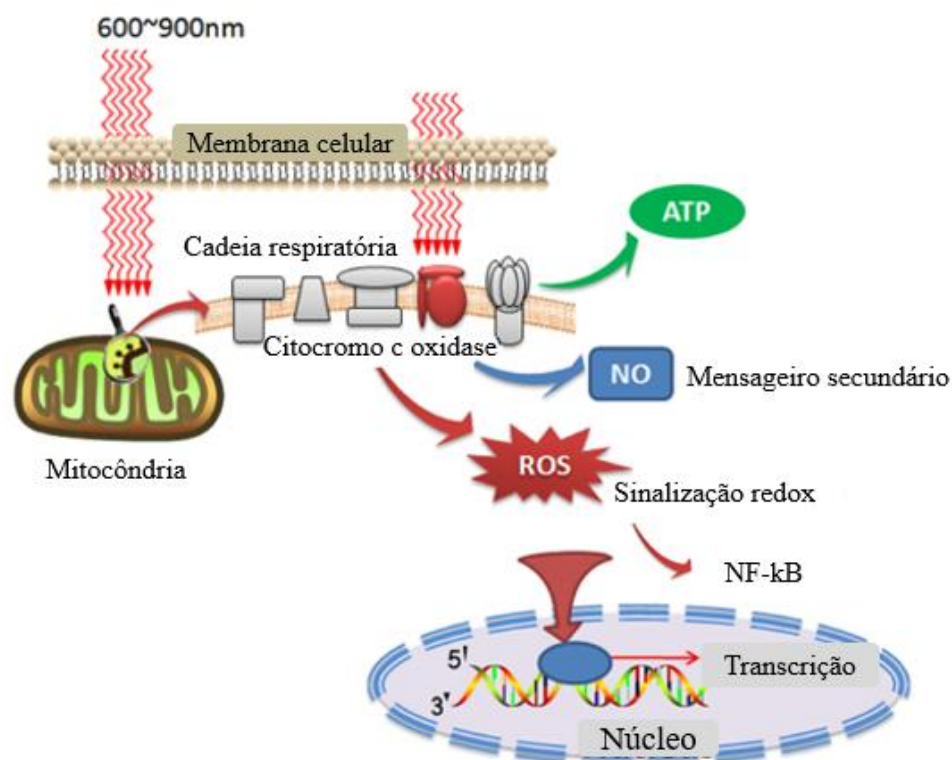


Outro fator importante, são as alterações no estado redox que induzem a ativação de inúmeras vias de sinalização intracelular, regulam a síntese de ácidos nucléicos, síntese proteica, ativação enzimática e a progressão do ciclo celular (LIU *et al.*, 2005). Estas respostas citosólicas, por sua vez, induzem alterações transcricionais. Dessa forma, propõe-se que a fotobiomodulação produza uma mudança no potencial redox total da célula na direção de uma maior oxidação (KARU, 1999; HAMBLIN, 2018). Células diferentes em uma gama de condições de crescimento têm estados redox distintos. Portanto, os efeitos da fotobiomodulação podem variar consideravelmente. As células que estão inicialmente em um estado mais reduzido (baixo pH intracelular) têm alto potencial para responder à FBM, enquanto as células no estado redox ótimo respondem fracamente ou não respondem ao tratamento com luz (CHEN *et al.*, 2011; HAMBLIN, 2018).

Muitos dos mediadores secundários de FBM (NO, ROS, do inglês, “reactive oxygen species” e cAMP, do inglês, “cyclic adenosine 3’,5’-monophosphate”) são capazes de ativar fatores de transcrição e aumentar sua expressão gênica. Esta

ativação dos fatores de transcrição é proposta para explicar porque uma exposição relativamente breve à luz pode ter efeitos de longa duração (KIM, 2014; POLLACK, 2014). Porém, o mais importante é o fator nuclear B (NF- κ B, do inglês, “factor nuclear kappa B”). O NF- κ B é um fator de transcrição que regula a expressão de vários genes relacionados com muitas funções celulares, isto é, respostas e sobrevivência induzidas por estresse e inflamatórias (CHEN *et al.*, 2011; AVCI *et al.*, 2013; CARROLL *et al.*, 2014). Sua ativação por meio da luz é fundamental para causar a transcrição de produtos gênicos protetores e estimulatórios (Figura11).

Figura 11 - Representação esquemática das vias de sinalização celular desencadeadas pela FBM. Depois que os fótons são absorvidos pelos cromóforos na mitocôndria, a respiração e o ATP aumentam, mas além disso, moléculas sinalizadoras, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) também são produzidas. Espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas como resultado dos efeitos da LLLT na mitocôndria podem ativar o fator de transcrição NF- κ B sensível a redox. Adaptado de Huang *et al.*, 2011.



Dessa forma, a analgesia mediada pela luz baixa poderia ser mediada por vários efeitos, como a absorção de luz pela biomodulação de cromóforos mitocondriais (principalmente Cox, do inglês, “cytochrome c oxidase”), vasodilatação, estimulação da divisão celular, liberação de NO, aumento dos níveis de cortisol e

síntese proteica, aumento da concentração de cálcio intracelular e aumento da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016; HAMBLIN, 2018). Porém, a terapia de luz de baixa intensidade pode ser usada para a inibição da dor e para condições patológicas associadas ao sistema nervoso. Os estudos realizados com FBM em dor aguda (PIGATTO *et al.*, 2017) e analgesia pré-operatória mostram que um único tratamento é suficiente para causar analgesia, enquanto para dor crônica e algumas condições degenerativas, mais sessões são necessárias (BJORDAL *et al.*, 2003; CHUNG *et al.*, 2012; GÁL *et al.*, 2018).

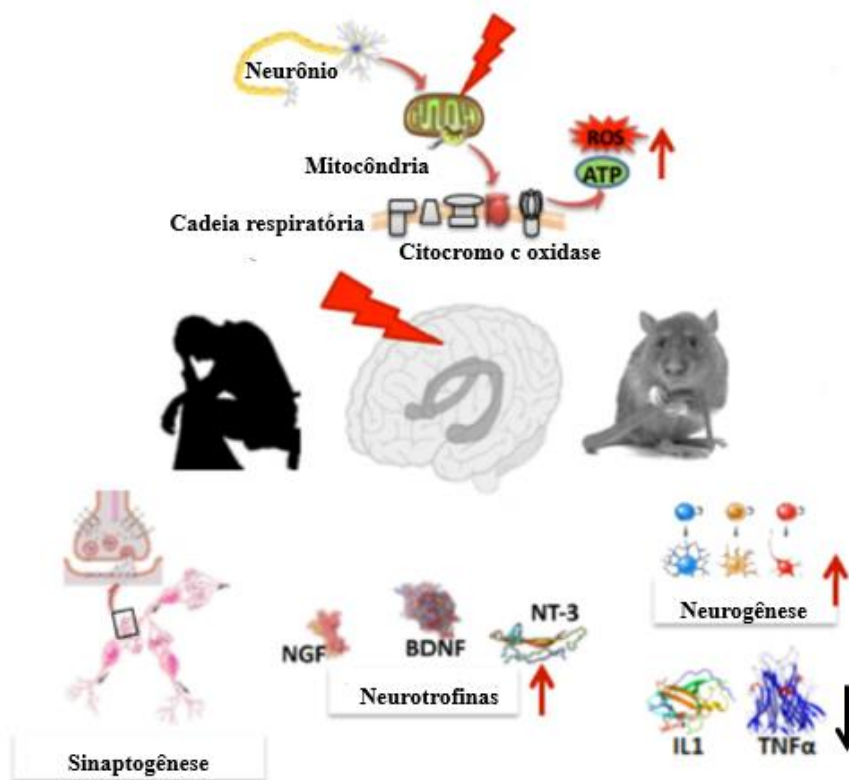
Alguns estudos clínicos demonstraram a eficácia da analgesia induzida por FBM (MARKOVIC; TODORVIĆ, 2006; TANBOGA *et al.*, 2011; CHOW; ARMATI, 2016), geralmente no espectro vermelho ou infravermelho próximo de baixa potência, e parece que a redução da dor é devida a um bloqueio de condução de fibras nervosas centrais e periféricas e à liberação de endorfinas (YAN; CHOW; ARMATI, 2011; KHUMAN *et al.*, 2012; CARROLL *et al.*, 2014). Da mesma forma, muitos estudos analisaram os efeitos do FBM na dor em modelos experimentais inflamatórios e de dor neuropática (SOUSA; FERRARESI; HAMBLIN, 2014; DE SOUSA *et al.*, 2016). Os resultados demonstraram redução da dor e um aumento nos níveis de aumento de TBARS (do inglês, “thiobarbituric acid reactive”) prevenido por interleucina 10 (IL-10) em ambas as fases aguda e crônica, aumento da atividade de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) apenas na fase aguda (MARTINS *et al.*, 2016). Outro estudo mostrou que a FBM reduziu a expressão do marcador pró-inflamatório (Iba1) na microglia no gânglio da raiz dorsal e no corno dorsal da medula espinal (KETZ *et al.*, 2016).

Um estudo demonstrou que o FBM poderia suprimir a sinalização de fibra aferente, bem como modular a transmissão sináptica para os neurônios do corno dorsal da medula espinal, e isso pode levar à depressão da dor a longo prazo (YAN; CHOW; ARMATI, 2011). A Luz, quando absorvida pelos nociceptores, pode inibir as fibras A δ e C, promover diminuição da velocidade de condução, redução da amplitude do potencial de ação composto e supressão da inflamação neurogênica. No caso do FBM, a luz pode bloquear o transporte anterógrado de mitocôndrias ricas em ATP nos neurônios do gânglio da raiz dorsal do nervo espinal. Essa inibição é completamente reversível em 48 horas e leva à formação de varicosidades, que geralmente estão associadas à ruptura dos microtúbulos (a interrupção do fluxo axônico rápido pode

reduzir a disponibilidade de ATP, o que é necessário para a polimerização microtúbulos e manutenção do potencial de repouso) (CARROLL *et al.*, 2014).

Pesquisas recentes sustentam a capacidade da luz penetrar no cérebro e exercer efeitos biológicos em moléculas fotorreceptoras presentes nas estruturas do sistema nervoso central (Figura 12) (GONZALEZ-LIMA; ROJAS, 2011; DE SOUSA *et al.*, 2016; SALEHPOUR *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019). Estudos demonstraram aumento de células neuroprogenitoras, aumento de neurotrofinas e sinaptogênese (HAMBLIN, 2016; HENNESSY; HAMBLIN, 2018).

Figura 12 - Processos específicos de tecidos que ocorrem após FBM e beneficiam uma variedade de distúrbios cerebrais. Fator de crescimento nervoso (NGF, do inglês, “nerve growth factor”), Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF, do inglês “brain-derived neurotrophic factor”), Neurotrofina-3 (NT-3, do inglês, “Neurotrophin-3”), Interleucina-1 (IL-1, do inglês, “Interleukin-1”) e Fator de necrose tumoral (TNF- α , do inglês, “tumor necrosis factor”). Adaptado de Hamblin, 2016.



Porém, há poucos estudos da ação analgésica da FBM por meio de substâncias endógenas (HAGIWARA *et al.*, 2007; HSIEH; HONG; CHOU, 2015) assim como resultados duais referentes a esse mecanismo (SERRA E PERES; ASHMAWI, 2010). Portanto, a compreensão das respostas celulares fotobiológicas induzidas pelo LED necessita ser discutida à luz dos avanços na ciência básica, para o

esclarecimento ou descoberta de mecanismos responsáveis pela efetividade do tratamento.

3 JUSTIFICATIVA

Segundo dados da OMS, estima-se que cerca de 30% da população mundial adulta sofra de dor, sendo que, no Brasil, 70% das buscas por consultas médicas estão relacionadas com algum tipo de dor. Apesar dos esforços para aumentar a conscientização, a dor inadequadamente gerenciada é um problema persistente. A percepção inadequada da dor aguda como mais simples do que a dor crônica pode resultar das preocupações em relação ao desenvolvimento da dependência do paciente. Em muitos casos, a falta de tratamento adequado ou a inexistência de um tratamento realmente efetivo acaba levando a disfunções e até mesmo incapacidade transitória ou permanente afetando substancialmente a qualidade de vida e a capacidade produtiva desses pacientes. Neste sentido, a contínua busca por novas estratégias terapêuticas, que sejam eficazes e seguras, têm revelado alternativas bastante promissoras no controle da dor, relacionadas, por exemplo, à fotobiomodulação. No entanto, os medicamentos continuam a ser a principal ferramenta para o tratamento e controle dos estados dolorosos, e a fotobiomodulação representa uma inesgotável fonte de efeitos promissores para a pesquisa com potencial analgésico.

Neste contexto, há uma clara necessidade de implementar o estudo desta terapia para complementar o tratamento da dor, de forma segura e eficaz. Além disso, nos últimos anos, tem havido um número crescente de relatos demonstrando resultados promissores do FBM usado para a dor, na grande maioria dos comprimentos de onda infravermelho devido à melhor penetração tecidual da luz, e demonstrou-se melhora clinicamente relevante. Tem sido sugerido que o mecanismo da FBM para o alívio da dor esteja relacionado com o aumento da produção de serotonina, síntese de beta-endorfina, aumentar a latência nos nervos mediano e sural e suprimir a condução nervosa em fibras mielínicas A δ e C não mielinizadas usando um modelo animal. Neste sentido, justifica-se o estudo de mecanismos de ação adicionais àqueles já descritos na literatura sobre os efeitos analgésico da fotobiomodulação de baixa intensidade.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Estudar a hipótese do efeito antinociceptivo do LED infravermelho de baixa intensidade ser modulado pelo sistema endógeno descendente da dor em um modelo de nocicepção aguda.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Comparar o efeito do tratamento do LED em animais com e sem tricotomia;
- 2) Investigar o envolvimento dos sistemas inibitórios descendentes da dor por meio de interações farmacológicas, no efeito antinociceptivo do LED;
- 3) Investigar o efeito do LED na ativação da proteína c-Fos induzida pelo cinamaldeído no corno dorsal da medula espinal e estruturas supraespinais por meio da técnica de imunistoquímica e imunofluorescência;
- 4) Avaliar o efeito do LED, sobre a expressão da proteína c-Fos induzida pelo cinamaldeído no corno dorsal da medula espinal por meio da técnica de Western Blot;
- 5) Investigar a participação do sistema monoaminérgico no efeito antinociceptivo do LED por meio de testes de nocicepção, após lesão com neurotoxinas específicas;
- 6) Investigar o efeito do LED na modulação de componentes do sistema noradrenérgico e serotoninérgico do tronco encefálico (enzimas, TH, DH e TPH) no modelo de nocicepção induzido por cinamaldeído;
- 7) Abordar a possibilidade da antinocicepção do LED ser o resultado de ansiedade, com e sem a via noradrenérgica por meio do teste do labirinto em cruz elevado.
- 8) Abordar a possibilidade da antinocicepção do LED ser o resultado de um comprometimento motor, por meio do teste do campo aberto.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Os experimentos foram realizados com 356 camundongos Swiss machos pesando de 25 a 35g, mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, sob temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e com água e ração “*ad libitum*”. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da USP, “Campus” de Ribeirão Preto, mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia de Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram aclimatados na sala de experimentação durante 1 hora antes dos experimentos. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais acordados, recomendadas pela IASP (International Association for the Study of Pain) e foram iniciados apenas após serem obtidos os protocolos de aprovações pelo comitê de ética da UNIARA (CEUA/UNIARA: 026/16) e do comitê de ética da FMRP/USP (CEUA/USP: 131/17). O número de animais e a intensidade do estímulo nocivo foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos consistentes do tratamento com o LED.

5.2 Aplicação do LED

O tratamento proposto constituiu-se na irradiação com LEDs, mediante a utilização do equipamento Anodyne®, cujo comprimento de onda é 890nm, com emissão de 60 diodos de 13mW cada, totalizando potência máxima de 780mW e densidade de energia de $41,6\text{J}/\text{cm}^2$. Os animais receberam como tratamento uma dose de 50% do máximo (Tabela 2), determinado em um estudo prévio (PIGATTO *et al.*, 2017). Foi utilizada uma placa terapêutica por animal neste estudo. O diodo emissor de luz da placa foi posicionado abaixo de uma plataforma de teste acrílico (10 x 4,5 x 4 cm), e a radiação infravermelha foi aplicada diretamente na região ventral do animal num tempo de 20 minutos (Figura 13). O aparelho foi aferido no grupo de óptica do Instituto de Física da USP, São Carlos.

Tabela 2 – Parâmetros utilizados com os LEDs no estudo.

Aparelho	Anodyne®
Local de aplicação	Corpo inteiro
Comprimento de onda	890nm
Tempo de exposição (s)	20min
Área de irradiação (cm²)	22,5cm ²
Tipo de aplicação	Corpo inteiro
Potência (mW)	390mW
Densidade de energia (J/cm²)	20,8J/cm ²
Densidade de potência (mW/cm²)	17,3mW/cm ²
Energia total (J)	468J
Modo de operação	Pulsado
Frequência (Hz)	292Hz
Polarização	Não
Frequência de tratamento	1 aplicação

Figura 13 - Representação esquemática da aplicação do LED (890nm).



5.3 Protocolos experimentais

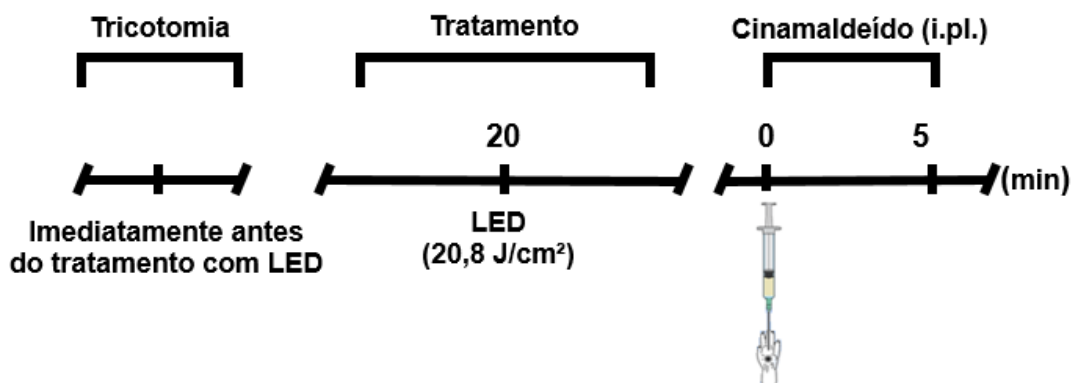
5.3.1 Parte I - Comparação do LED (890nm, 20,8J/cm²) em animais com e sem tricotomia no modelo de nocicepção induzida por cinamaldeído administrado por via intraplantar

Experimento 1) O primeiro experimento visou avaliar o efeito antinociceptivo do LED poderia ser diferente em animais com e sem tricotomia no modelo de nocicepção induzida por cinamaldeído administrado por via intraplantar, uma vez que, outros vieses foram descartados em um estudo anterior (PIGATTO *et al.*, 2017). Após um período de adaptação, primeiramente foi realizada a tricotomia em um grupo de animais, em seguida realizado o tratamento com o LED, em seguida, os camundongos receberam uma injeção de 20µl cinamaldeído (um ativador do canal TRPA1, 10nmol/pata) na superfície ventral da pata traseira direita (Figura 14). Os animais foram colocados individualmente em uma câmara de acrílico, e foi registrado com um cronômetro o tempo de lambida e mordida da pata por 5min. A quantidade de tempo gasto lambendo/mordendo a pata injetada foi considerada indicativa de nocicepção.

Grupos

Grupo controle, grupo tratado com LED com tricotomia e LED sem tricotomia. Total de grupos: 3, (6 animais por grupo).

Figura 14 - Representação esquemática da comparação do tratamento do LED (890nm, 20,8J/cm²) em animais com e sem tricotomia. No modelo de nocicepção induzida por cinamaldeído administrado por via intraplantar



5.3.2 Parte II - Ensaios farmacológicos

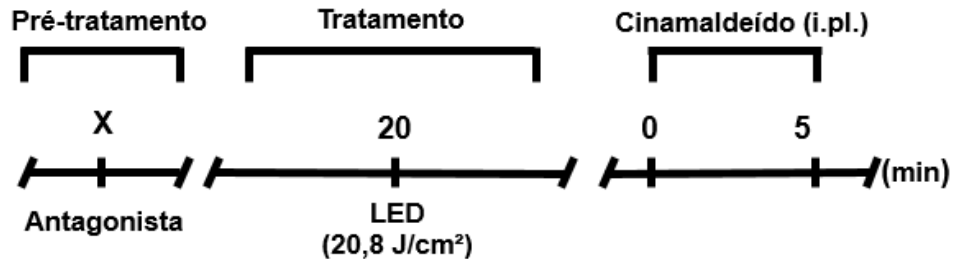
5.3.2.1 Envolvimento dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico, opioidérgico, GABAérgica e colinérgico

Experimento 1) Para avaliar o envolvimento dos sistemas descendentes inibitórias da dor, foram realizados experimentos com administração intratecal de salina para o grupo controle, metisergida (antagonista não seletivo de receptores serotoninérgicos, 20µg/sítio) (KWON *et al.*, 2005), maleato de WAY-100635 (antagonista seletivo de receptores serotoninérgicos 5HT-1, 10µg/sítio) (NAKAMOTO *et al.*, 2015), cetanserina (antagonista seletivo de receptores serotoninérgicos 5HT-2, 10µg/sítio) (GENCER; GUNDUZ; ULUGOL, 2015), MDL 72222 (antagonista seletivo de receptores serotoninérgicos 5HT-3, 15µg/sítio) (KIM *et al.*, 2016b), 5, 15, 5 e 20 minutos, respectivamente, antes do tratamento com o LED. Fentolamina (antagonista não seletivo de receptores α -adrenérgicos, 1µg/sítio) (ANDOH; GOTOH; KURAISHI, 2013) prazosin (antagonista seletivo de receptores adrenérgicos α 1, 20µg/sítio), yohimbina (antagonista seletivo de receptores adrenérgicos α 2, 20µg/sítio) (GE; ZENG; TAN, 2005), propranolol (antagonista não seletivo de receptores β -adrenérgicos, 200µg/sítio) (GENCER; GUNDUZ; ULUGOL, 2015), 5, 5, 5 e 30 minutos, respectivamente, antes do tratamento com o LED. Haloperidol (antagonista não seletivo de receptores dopaminérgicos, 1nmol/sítio) (HORNFELODT; KITTO; LARSON, 1996), 15 minutos antes do tratamento com o LED. Naloxona (antagonista não seletivo de receptores opioides, 20µg/sítio) (KWON *et al.*, 2005), D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂ (CTOP) (antagonista seletivo de receptores opioides μ 1/ μ 2, 175pmol/sítio) (MIZOGUCHI *et al.*, 2014), 5 e 10 minutos, respectivamente, antes do tratamento com o LED. Bicuculina (antagonista seletivo de receptores GABAérgicos do tipo GABAA, 0,5µg/sítio) (PENG *et al.*, 2015), faclofeno (antagonista seletivo de receptores GABAérgicos do tipo GABAB, 5µg/sítio) (SIM *et al.*, 2013), 5 e 5 minutos, respectivamente, antes do tratamento com o LED. Atropina (antagonista não seletivo de receptores muscarínicos, 20ng/sítio), hexametileno (antagonista não seletivo de receptores nicotínicos, 100ng/sítio) (YOON *et al.*, 2005), 5 e 15 minutos, respectivamente, antes do tratamento com o LED (Figura 15).

Grupos: 32 (6 animais).

OBS: O teste comportamental realizado após a administração dos fármacos, nocicepção induzida por cinamaldeído, já explicado no item 5.3.1.

Figura 15 - Representação esquemática dos ensaios farmacológicos administrados por via intratecal. (X) representa o tempo após a administração do(s) antagonista(s) de cada sistema estudado, já explicado no item 5.3.2.1.



5.3.2.2 Envolvimento do sistema opioidérgico

Experimento 2) Uma vez que, a naloxona administrada via intratecal preveniu o efeito antinociceptivo do LED, investigamos a administração de naloxona via intracerebroventricular. A implantação cirúrgica da cânula no ventrículo lateral encefálico foi conduzida em um ambiente asséptico, como descrito anteriormente (PAXINOS; FRANKLIN, 2001; HAN *et al.*, 2014). Os camundongos foram anestesiados com cetamina 90mg/Kg e xilazina 12mg/Kg por via intraperitoneal, respectivamente, e colocados em um aparelho de estereotaxia. Foi realizada tricotomia da área de incisão do couro cabeludo, e realizada uma incisão sagital na linha média, expondo a superfície do crânio. Um único furo foi perfurado através do crânio alvo. As coordenadas para o posicionamento da cânula, foram as seguintes: 3mm posterior ao bregma, médio lateral de 1 mm e 3 mm dorso-ventral da superfície do crânio para o ventrículo lateral (injeção intracerebroventricular). Para evitar a oclusão, uma haste foi inserida na cânula guia. A agulha de injeção se projetou 0,5 mm a partir da extremidade final da cânula guia. Acrílico dental foi usado para fixar a cânula guia no crânio. Após a cirurgia, os animais foram observados até a recuperação de 7 dias; durante este tempo, os camundongos foram manipulados suavemente e diariamente para minimizar o estresse associado com a manipulação dos animais durante os experimentos.

Administração da droga

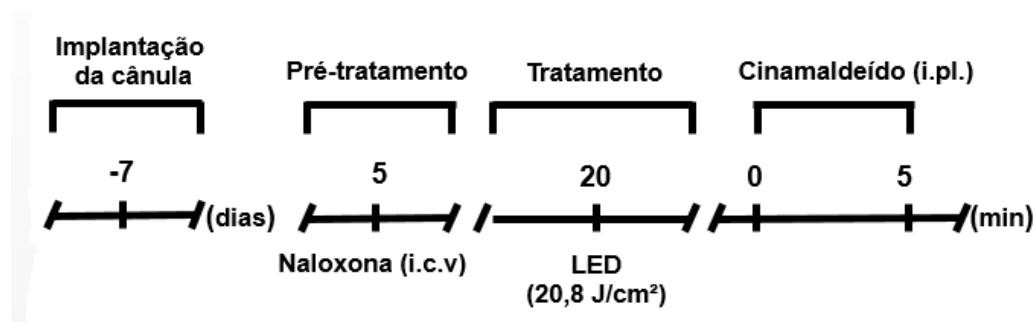
A droga foi administrada no ventrículo lateral em um volume fixo de 4 ml (em uma taxa constante de 10 ml/min). Foi realizada a administração da naloxona na dose de 5ug/3ul por via intracerebroventricular (CHEN *et al.*, 2014), 5 minutos após, os

animais foram tratados com o LED e em seguida foi administrado por via intraplantar 20 μ l cinamaldeído, já explicado no item 5.3.1 (Figura 16).

Grupos

Controle (salina), naloxona, LED, naloxona + LED. Grupos: 4 (6 animais). Total de animais: 24

Figura 16 - Representação esquemática do ensaio farmacológico administrado por via intracerebroventricular.



Experimento 3) Como foi observado que praticamente todos os antagonistas dos sistemas avaliados preveniram o efeito do LED, investigamos se o LED poderia reduzir a expressão da proteína c-Fos no corno dorsal da medula espinal. Para isto, foi realizada a técnica de imunistoquímica, imunofluorescência e “Western Blotting”, de acordo com os itens 5.4.1, 5.4.2 e 5.4.3, respectivamente. Também foi investigado se o LED poderia aumentar a expressão da proteína c-Fos nas três principais estruturas supraespinais das vias descendentes inibitórias da dor (PAG, LC, RMg). Para isto, foi realizada a técnica de imunistoquímica e imunofluorescência, de acordo com os itens 5.4.1 e 5.4.2, respectivamente.

5.3.3 - Parte III - Lesões com neurotoxinas seletivas de vias monoaminérgicas

Experimento 1) Uma vez observado o envolvimento de vários sistemas inibitórios da dor e o LED reduziu a expressão da proteína c-Fos no corno dorsal da medula espinal e aumentou nas principais estruturas supraespinais envolvidas no controle descendente inibitório da dor, investigamos se a depleção das principais vias inibitórias da dor poderia interferir no efeito antinociceptivo do LED. As neurotoxinas, 6-OHDA (20 μ g), DSP-4 (20 μ g) e 5,7-DHT (50 μ g) foram injetadas por via intratecal para degenerar terminais noradrenérgicos e serotoninérgicos na medula espinal. Foi injetado 30 minutos antes da injeção de 5,7-DHT, foi administrado (25mg/kg, i.p.) de

desipramina. O uso de desipramina foi feito para bloquear a absorção não específica de 5,7-DHT em terminais noradrenérgicos. A avaliação do efeito do LED nos modelos de dor com o cinamaldeído, já explicado no item 5.3.1 e placa quente (Figura 17) foi realizado antes e 3 dias após as injeções de 6-OHDA, DSP-4, e 5,7-DHT (CHOI *et al.*, 2003; HUNG *et al.*, 2003; KREMER *et al.*, 2018).

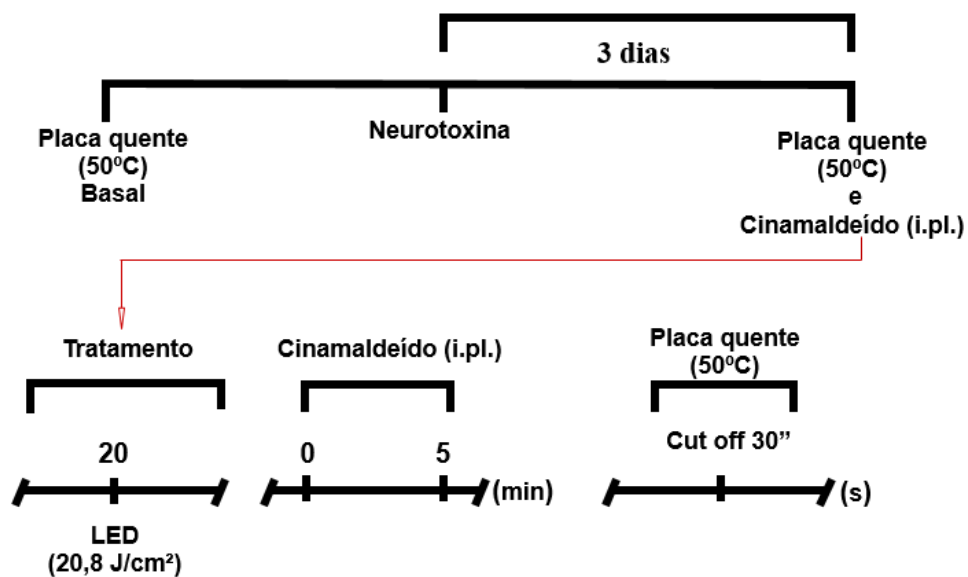
Grupos

Controle (salina), 6-OHDA, 6-OHDA+LED, DSP-4, DSP-4 + LED, 5,7-DHT, 5,7-DHT + LED. Grupos: 7 (6 animais). Total de animais: 42

5.3.3.1 Teste da placa quente

O teste da placa quente foi usado para medir as latências de resposta de acordo com um método previamente descrito (PIGATTO *et al.*, 2017). Neste experimento, uma placa quente (AVS Projetos, Campinas, SP, Brasil) foi mantida a $50\pm 1^\circ\text{C}$. Os animais foram colocados em câmaras plásticas claras na superfície do aparelho, e o tempo (s) entre a colocação e a agitação ou lambida das patas ou saltos foi registrado como o índice de latência da resposta. Um período de latência (cut-off) de 30s foi definido como analgesia completa. Para determinar a linha de base, cada animal foi testado antes do tratamento com irradiação de LED.

Figura 17 - Representação esquemática da lesão neurotóxica administrada por via intratecal.



Experimento 2) Para confirmar as lesões com as neurotoxinas (6-OHDA e DSP-4) foi realizada a marcação de TH e D β H no corno dorsal da medula espinal e

LC e, com a neurotoxina 5,7-DHT foi realizada a marcação de TPH no RMg e 5-HT no corno dorsal da medula espinal e RMg pela técnica de imunofluorescência, de acordo com o item 5.4.2.

Experimento 3) Visto que há um envolvimento dos sistemas inibitórios da dor, assim como, das principais vias inibitórias da dor e o LED reduziu a expressão da proteína c-Fos no corno dorsal da medula espinal, investigamos qual seria o efeito do LED na expressão da proteína c-Fos no corno dorsal da medula espinal, após a depleção das principais vias inibitórias da dor. Para isto, foi realizada a técnica de imunofluorescência de acordo com o item 5.4.2.

5.3.4 – Parte IV - Caracterização farmacológica do efeito antinociceptivo do LED (890; 20,8J/cm²) no comportamento semelhante à ansiedade aferido no teste do labirinto em cruz elevado (LCE).

Experimento 1) Para abordar a possibilidade da antinocicepção do LED ser o resultado de ansiedade, uma vez que, foi observado o envolvimento do sistema noradrenérgico, realizamos o teste do LCE.

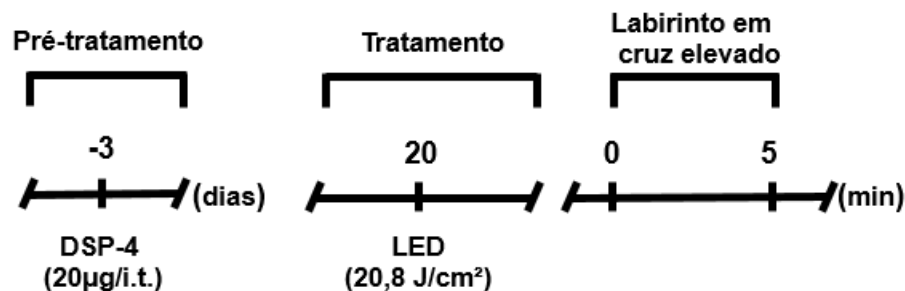
Os animais foram pré-tratados com DSP-4 (20µg/i.t.), 3 dias após a injeção da neurotoxina um grupo de animais foram tratados com LED e outro grupo não, e foram avaliados no LCE (Figura 18). O LCE consiste em quatro braços elevados (50 cm) dois abertos, 30 cm x 7 cm e dois braços fechados 31 cm x 7 cm x 35 cm, todos com teto aberto. Os braços foram dispostos de modo que os dois braços abertos ficassem opostos um ao outro e conectados à área central 7 cm x 7 cm contendo paredes opacas de 30 cm de altura. Os testes de LCE ocorreram em uma sala silenciosa com iluminação ambiente. No dia do teste, os camundongos foram levados para se acostumarem à sala de teste por 20 minutos. Cada camundongo foi colocado em um braço fechado, de frente para a plataforma de entrada e os companheiros de gaiola começaram no mesmo braço fechado. Cada camundongo teve 5 minutos para explorar o LCE e depois retornou à sua gaiola. Entre uma e outra exposição dos animais, o LCE foi cuidadosamente limpo com álcool 70%. O desempenho no LCE foi gravado usando uma câmera de vídeo suspensa (Sony Handycam HDR-CX350, Konan, Minato-ku, Tokyo, Japan) para quantificação posterior por meio do software X-Plo-Rat versão 1.1.0, 2005. As entradas de braço aberto e fechado foram definidas como as duas patas dianteiras entrando no braço, e o tempo do braço aberto começou

no momento em que as patas dianteiras entraram nos braços abertos e terminaram na saída. (IBRAHIM *et al.*, 2018).

Grupos

Controle (salina), DSP-4, LED, DSP-4 + LED. Grupos: 4 (6 animais). Total de animais: 24

Figura 18 - Representação esquemática da caracterização farmacológica com DSP-4 (20 μ g/i.t.) no LCE.



5.3.5 – Parte V - Teste do campo aberto

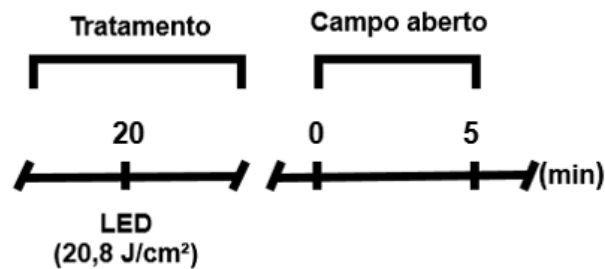
Experimento 1) Para abordar a possibilidade da antinocicepção do LED ser o resultado da redução da atividade locomotora, foi realizado o teste do campo aberto.

A fim de avaliar a atividade locomotora espontânea dos animais, a deambulação foi avaliada pelo teste do campo aberto. O aparato consistiu em uma arena circular de madeira com 62 cm de diâmetro x 29,5 cm de altura, pintada inteiramente de branco (campo aberto). O assoalho dessa arena é dividido por meio de três círculos concêntricos subdivididos através de segmentos de retas em dezenove partes de tamanho semelhante, de acordo com (EYSENCK, 2014).

Após o tratamento com o LED, os animais foram colocados individualmente no centro da arena, permitindo que explorassem livremente o aparato por um período de 5 min. No decorrer deste período foi avaliado o tempo que os animais permaneceram na periferia e no centro e o número de unidades de locomoção percorridas (Figura 19). Cada unidade de locomoção correspondeu ao ato do animal entrar com as quatro patas nas divisões marcadas no fundo da arena. A soma destas unidades foi

registrada e expressa como número de cruzamentos. Entre as observações de cada animal, o aparato foi limpo com solução de álcool 70%.

Figura 19 - Representação esquemática da avaliação locomotora após exposição ao LED no teste do campo aberto.



5.4 - Imunomarcção da proteína c-Fos, tirosina hidroxilase (TH), dopamina- β -hidroxilase (D β H), triptofano hidroxilase (TPH) e 5-hidroxitriptamina (5-HT)

5.4.1 Ensaio de imunoistoquímica

Uma hora após a injeção intraplantar de cinamaldeído, os animais foram anestesiados com cetamina 90mg/Kg e xilazina 12mg/Kg por via intraperitoneal, respectivamente e, logo depois, perfundidos via transcardíaca com PBS 0,01M seguido de paraformaldeído 4% tamponado em tampão fosfato a 0,1M. Após a perfusão, a medula foi seccionada na porção L4-L6 e o tronco encefálico transversalmente seccionado em nível de (PAG, LC e RMg) os cortes foram mantidos por 2 horas em paraformaldeído a 4% para pós-fixação. Em seguida, os mesmos ficaram em uma solução hipertônica de sacarose (30%), por cerca de 24 horas, para crioproteção do material. Após esse procedimento, a medula e o tronco encefálico foram incluídos em meio para cortes sob congelamento Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura Finetek), rapidamente congelados em gelo seco e estocadas a -70°C. Os cortes histológicos foram realizados em criostato (Leica CM1850, Alemanha) com espessura de 15 μ m e estocados em 2mL de PBS.

As secções foram lavadas e incubadas com anticorpo de coelho (1: 1000 em PBS 0,1M e "Triton" 0,1%, sc-52, Santa Cruz) "overnight". Em seguida, estas foram processadas pelo método avidina-biotina imunoperoxidase (kit Vectastain ABC, Vector Lab, EUA) e a imunoreatividade para c-Fos foi revelada por meio da adição do cromógeno diaminobenzidina (Sigma).

As lâminas foram, então, montadas e vistas por meio de microscópio de luz (Olympus BX50, Japão), acoplado a uma câmera (Olympus DP72, Japão). Foram considerados neurônios positivos para c-Fos aqueles que apresentaram manchas marrons no interior do núcleo. A contagem, embora realizadas com o auxílio de um “software” de análise de imagem computadorizada (Image J), foi realizada manualmente.

5.4.2 Ensaio de imunofluorescência

Uma hora após a injeção intraplantar de cinamaldeído os animais foram os animais foram anestesiados com cetamina 90mg/Kg e xilazina 12mg/Kg por via intraperitoneal, respectivamente, e perfundidos por via transcardíaca com solução salina, seguida por paraformaldeído a 4% (PFA) de em tampão de fosfato a 0,1 M (PBS, pH 7,4). Após a perfusão, a medula foi seccionada na porção L4-L6 e o tronco encefálico transversalmente seccionado em nível de porções (PAG, LC e RMg) os cortes foram mantidos por 2 horas em paraformaldeído a 4% para pós-fixação. Em seguida, os mesmos ficaram em uma solução hipertônica de sacarose (30%), por cerca de 24 horas, para crioproteção do material. Após esse procedimento, a medula e o tronco encefálico foram incluídos em meio para cortes sob congelamento Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura Finetek), rapidamente congelados em gelo seco e estocadas a -70°C. Os cortes histológicos foram realizados em criostato (Leica CM1850, Alemanha) com espessura de 15µm e estocados em 2mL de PBS.

Para execução da técnica, primeiramente, as secções foram lavadas 3 vezes em PBS por 5 minutos cada lavagem e incubadas em solução de glicina 0,1 M por 30 minutos, para retirada completa de grupos aldeídos. Novamente, os cortes foram lavados em PBS (3 vezes de 5 minutos) e em seguida realizou-se o bloqueio de ligações inespecíficas, pela incubação com solução de albumina sérica bovina (BSA) 2% e “Triton” X® 0,1% diluídos em PBS, por 1 hora. Após o bloqueio, os cortes foram incubados com os seguintes anticorpos primários: anti-Fos (1:4000) produzido em coelho (ab190289 - Abcam), anti-tirosina hidroxilase (1:200) produzido em coelho (T8700 - Sigma), anti-dopamina β-hidroxilase (1:200) produzido em coelho (sc-15318 – Santa Cruz), anti-triptofano hidroxilase (1:200) produzido em coelho (ab227845 - Abcam) e anti-5-HT (1:100) produzido em cabra (AB_572262 – Immunostar). Todos os anticorpos foram diluídos na solução de bloqueio e mantidos “overnight” a 4°C.

Após esta etapa, os cortes foram novamente lavados em PBS (3 vezes de 5 minutos), seguindo-se a incubação dos anticorpos secundários fluorescentes apropriados: Alexa flúor 594 (1:400) anti-coelho ou Alexa flúor 594 (1:200) anti-cabra ou Alexa flúor 488 (1:400 e 1:8000) anti-coelho, por 2 horas, em temperatura ambiente. Posteriormente, as seções foram lavadas (3 vezes de 5 minutos) e montadas em lâminas silanizadas e cobertas com lamínula usando Fluoromount. (com DAPI). As imagens foram obtidas em microscopia confocal (SP5, Leica, Wetzlar, Alemanha e Zeiss).

5.4.3 Análise por “Western Blotting”

Extração de Proteínas

Uma hora após a injeção intraplantar de cinamaldeído a medula foi coletada e colocada em tampão RIPA Buffer® (sigma Aldrich) com inibidores de proteases, as amostras foram processadas com o uso do homogeneizador Dremel 10.8 V Lithium-íon/com ponteira de acrílico. O homogenato foi centrifugado a 13000 g (15 min) a 4°C. Uma alíquota do sobrenadante foi separada para dosagem de proteínas pelo método colorimétrico Coomassie (Bradford) “Protein Assay” Kit (Pierce, Rockford, IL USA).

Eletroforese e ImunoBlot

Volumes de amostras do homogenato, correspondentes a 40 µg de proteínas, foram incubadas com tampão de amostras na proporção (1:1), a 70° C durante (10 min). Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel gradiente de poliacrilamida 4-12% (1,5 mm de espessura) na presença de SDS (SDS-PAGE) para separação por eletroforese, utilizando-se o sistema “Mini-Protean II Electrophoresis Cell” (“Bio-Rad Laboratories”, Hercules CA, USA). A corrida foi feita sob voltagem inicial de 80 V, a partir de (30 min). Esta foi mudada para 100 V, utilizando-se o tampão de corrida Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM e SDS 0,1% p/v. As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membranas prontas (“Amersham Pharmacia Biotech”, “Little Chalfont”, UK), utilizando-se o sistema de transferência “Mini-Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories”, Hercules CA, USA). Após o fracionamento das proteínas, o gel e a membrana de nitrocelulose foram incubados no tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM, 20% de metanol) por (30 min). A transferência foi realizada sob voltagem constante de 100 V, durante (1 hora e 15 min). Após a transferência as membranas foram coradas com Ponceau 0,5% e ácido tricloroacético 3%, para certificação de que houve transferência das

proteínas. Em seguida, as membranas foram lavadas em água desionizada e o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado pela incubação das membranas por 2 horas, sob refrigeração, em solução tampão salina tris (TBS) contendo 7% (p/v) de leite desnatado (molico®), sob agitação contínua. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes com TBS contendo 0,1% de “Tween” 20, por (5 min). Em seguida foram incubadas por 24 horas em solução TBS-T, 1:500, onde foi adicionado anticorpo monoclonal de camundongo contra Fos (sc-166940).

Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 (min) com TBS contendo 0,1% “Tween” 20 e, em seguida, incubadas com IgG de coelho contra camundongo conjugado à peroxidase (1:2000; HRP; Jackson ImmunoResearch, PA, USA), por uma hora, a temperatura ambiente. Após esta incubação, as membranas foram novamente lavadas três vezes com TBS contendo 0,1% Tween 20 por (5 min). Para revelar as membranas, estas foram incubadas com uma mistura de reagentes do “kit” de quimioluminescência (ECL, “Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont”, UK) como descrito no manual de instruções e levadas ao aparelho (“Gel Doc™ XR+ System”) por aproximadamente (30 min).

5.5 Eutanásia

Após o final de cada experimento os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para posterior análise e avaliação do material coletado.

5.6 Análise estatística

Foi realizada uma análise do cálculo amostral e do poder da amostra previamente.

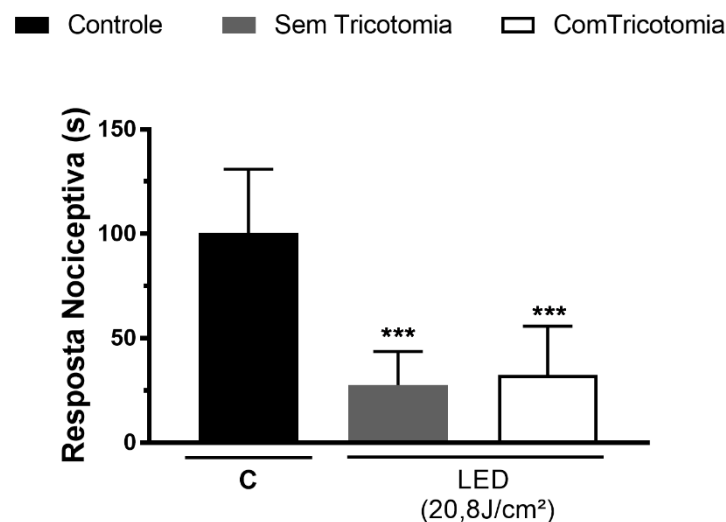
Os resultados foram apresentados como a média \pm SEM. Foi realizado teste de Levene para análise da homocedasticidade (homogeneidade das variâncias). Análise estatística foi realizada usando o teste t de Student não pareado, one-way (ANOVA) seguida, quando necessário, pelo teste de Tukey. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Parâmetros estatísticos foram calculados usando o “software” estatístico “Graph Pad Prism” (“Graph Pad Software 7.1, Inc”).

6 RESULTADOS

6.1 Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm²) na nocicepção induzida por cinamaldeído em animais com e sem tricotomia

Os resultados apresentados na Figura 20 demonstram que o tratamento com o LED reduziu a nocicepção promovida pelo cinamaldeído em camundongos ($p < 0,0001$) e a realização da tricotomia, não alterou o efeito do LED.

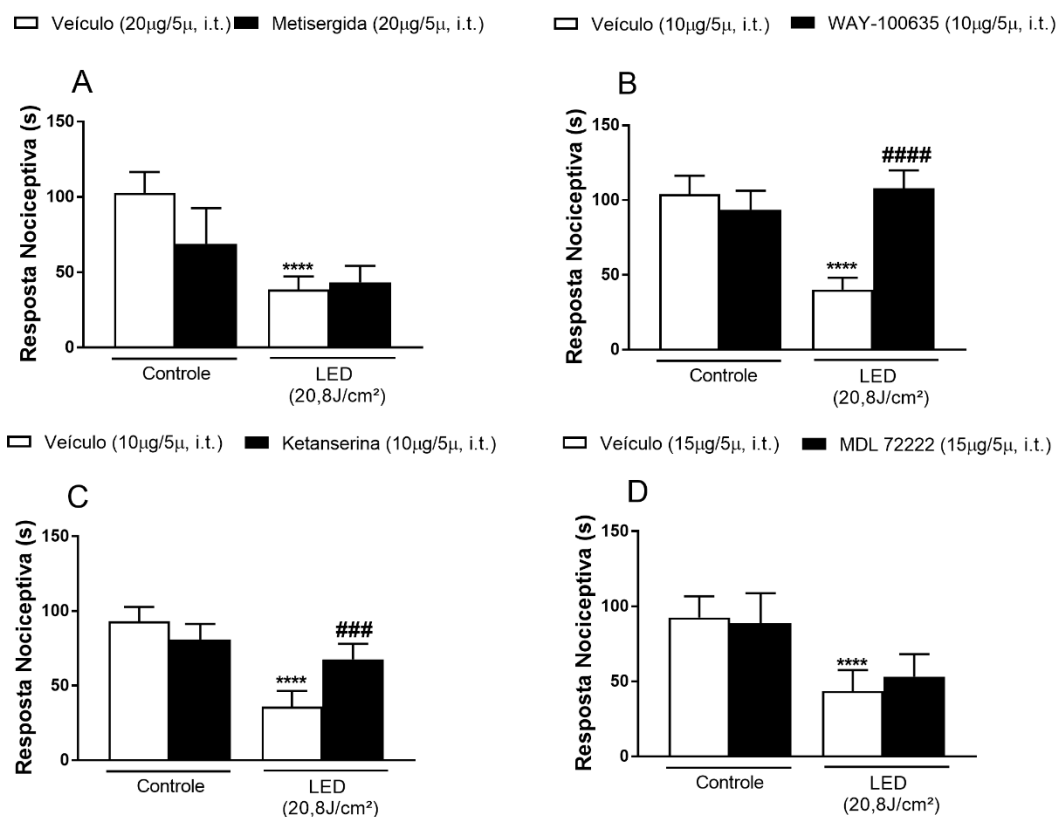
Figura 20 - Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm²) com e sem tricotomia sobre o comportamento nociceptivo após intraplantar de cinamaldeído. Coluna preta indica o grupo controle (C) e coluna aberta animais tratados com LED com tricotomia e cinza correspondem aos animais tratados com LED sem tricotomia. *** $p < 0,0001$ indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED com tricotomia ou sem tricotomia e o grupo controle não tratado, respectivamente. Os dados são expressos como a média \pm EPM, ($n = 8-10$ animais). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.



6.2 Envolvimento do sistema serotoninérgico

Os resultados apresentados na Figura 21 demonstram que o tratamento com o LED reduziu a nocicepção causada pelo cinamaldeído em camundongos ($p < 0,0001$) e que tal efeito foi prevenido pelo pré-tratamento dos animais com maleato de WAY-100635 (10 μ g/i.t.) ($p < 0,0001$), cetanserina (10 μ g/i.t.) ($p < 0,001$). No entanto, nem a metisergida (150pmol/i.t.), nem o MDL 72222 (15 μ g/i.t.), preveniram o efeito antinociceptivo do LED. A administração do maleato de WAY-100635, metisergida, cetanserina e MDL 72222 não causou nenhum efeito “per se” na nocicepção induzida pelo cinamaldeído, quando comparado com o grupo que recebeu veículo.

Figura 21 – Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo do LED (890nm; 20,8J/cm²) - Efeito da pré-administração de metisergida (150pmol/i.t.) (A), WAY-100635 (10µg/i.t.) (B), cetanserina (10µg/i.t.) (C), e o MDL 72222 (15µg/i.t.) (D) sobre a atividade antinociceptiva do LED. ****p<0,0001 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo controle não tratado, respectivamente. #####p<0,0001 e ###p<0,001 indicam diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo tratado com WAY-100635 + LED ou o grupo com cetanserina. + LED, respectivamente. Os dados são expressos como a média ± EPM, (n = 8-10 animais). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.

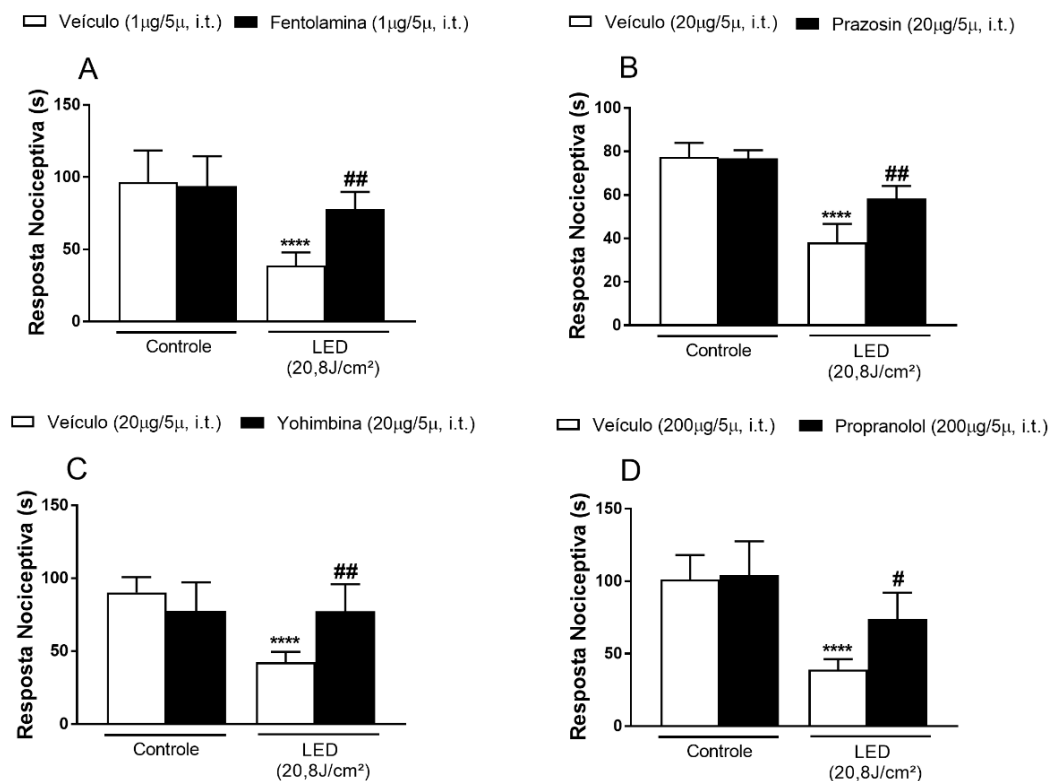


6.3 Envolvimento do sistema Noradrenérgico

Os resultados apresentados na Figura 22 demonstram que o tratamento com o LED reduziu a nocicepção causada pelo cinamaldeído em camundongos ($p < 0,0001$) e que tal efeito foi prevenido pelo pré-tratamento dos animais com a fentolamina (1µg/i.t.) ($p < 0,01$), prazosin (20µg/i.t.) ($p < 0,01$), yohimbina (20µg/i.t.) ($p < 0,05$) e propranolol (200µg/i.t.) ($p < 0,05$). A administração do fentolamina, prazosin, yohimbina

e propranolol não causou nenhum efeito “per se” na nocicepção induzida pelo cinamaldeído, quando comparado com o grupo que recebeu veículo.

Figura 22 – Envolvimento do sistema noradrenérgico no efeito antinociceptivo do LED (890nm; 20,8J/cm²) - Efeito da pré-administração de fentolamina (1µg/i.t.) (A), prazosin (20µg/i.t.) (B), yohimbina (20µg/i.t.) (C), propranolol (200µg/i.t.) (D) sobre a atividade antinociceptiva do LED. ****p<0,0001 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo controle não tratado, respectivamente. #p<0,05 e ##p<0,01 indicam diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo tratado com fentolamina + LED ou o grupo tratado com prazosin + LED ou o grupo tratado com yohimbina + LED ou o grupo tratado com propranolol + LED, respectivamente. Os dados são expressos como a média ± EPM, (n = 8-10 animais). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.

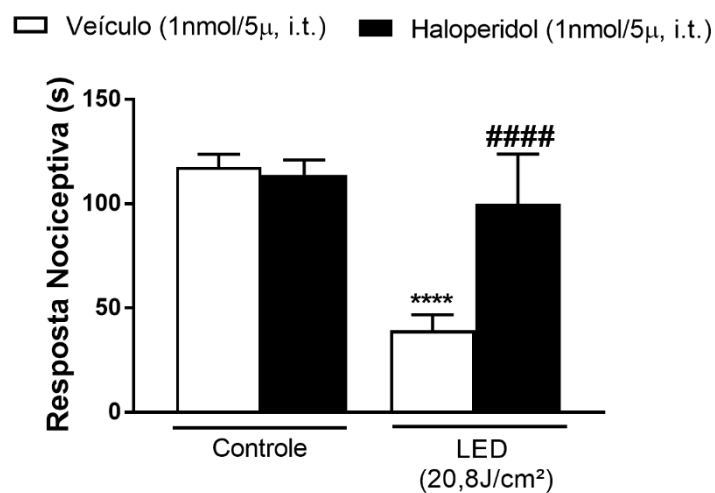


6.4 Envolvimento do sistema Dopaminérgico

Os resultados apresentados na Figura 23 demonstram que o tratamento com o LED reduziu a nocicepção causada pelo cinamaldeído em camundongos ($p < 0,0001$) e que tal efeito foi prevenido pelo pré-tratamento dos animais com a haloperidol (1nmol/i.t.) ($p < 0,0001$). A administração de haloperidol não causou nenhum efeito “per

se” na nocicepção induzida pelo cinamaldeído, quando comparado com o grupo que recebeu veículo.

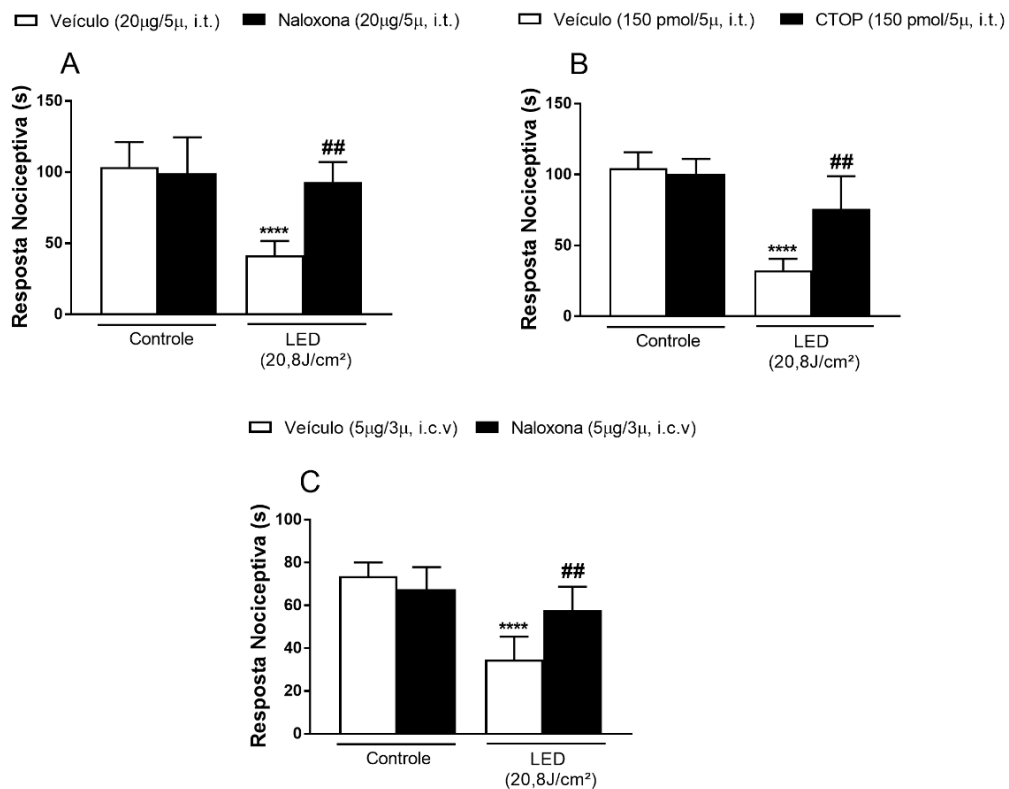
Figura 23 – Envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito antinociceptivo do LED (890nm; 20,8J/cm²) - Efeito da pré-administração de haloperidol (1nmol/i.t.) sobre a atividade antinociceptiva do LED. ****p<0,0001 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo controle não tratado, respectivamente. ####p<0,0001 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo tratado com haloperidol + LED. Os dados são expressos como a média ± EPM, (n = 8-10 animais). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.



6.5 Envolvimento do sistema opioidérgico

Os resultados apresentados na Figura 24 demonstram que o tratamento com o LED reduziu a nocicepção causada pelo cinamaldeído em camundongos ($p < 0,0001$) e que tal efeito foi prevenido pelo pré-tratamento dos animais com a naloxona (20µg/i.t.) ($p < 0,01$), naloxona (5µg/ i.c.v.) ($p < 0,01$) e CTOP (150pmol/i.t.) ($p < 0,01$). Nem a administração da naloxona, nem de CTOP causou efeito “per se” na nocicepção induzida pelo cinamaldeído, quando comparado com o grupo que recebeu veículo.

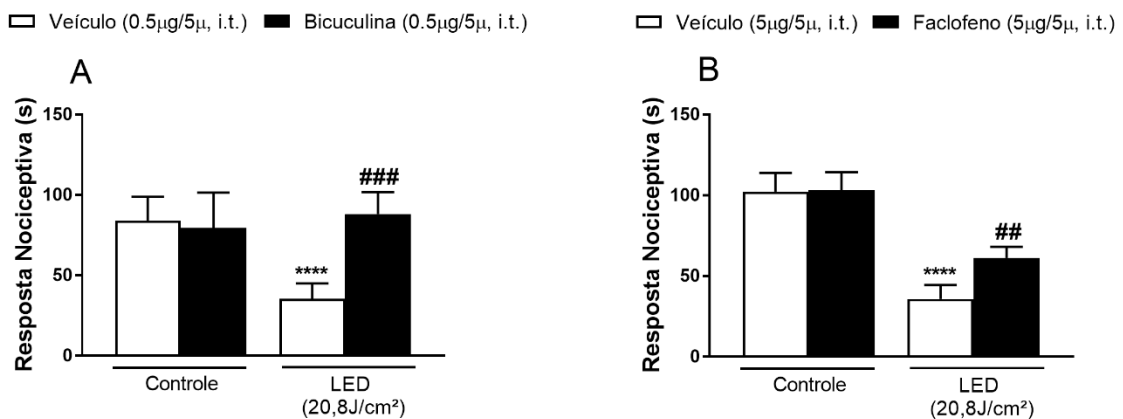
Figura 24 – Envolvimento do sistema opioidérgico no efeito antinociceptivo do LED (890nm; 20,8J/cm²) - Efeito da pré-administração de naloxona (20µg/i.t.) (A), CTOP (150pmol/i.t.) (B) e naloxona (5µg/ i.c.v.) (C) sobre a atividade antinociceptiva do LED. ****p<0,0001 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo controle não tratado, respectivamente. ##p<0,01 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo tratado com naloxona i.t. + LED ou o grupo tratado com naloxona i.c.v. + LED ou o grupo tratado com CTOP + LED, respectivamente. Os dados são expressos como a média ± EPM, (n = 8-10 animais). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.



6.6 Envolvimento do sistema GABAérgico

Os resultados apresentados na Figura 25 demonstram que o tratamento com o LED reduziu a nocicepção causada pelo cinamaldeído em camundongos ($p < 0,0001$) e que tal efeito foi prevenido pelo pré-tratamento dos animais com a bicuculina (0,5µg/i.t) ($p < 0,001$) e faclofeno (5µg/i.t) ($p < 0,01$). A administração da bicuculina e do faclofeno não causou nenhum efeito “per se” na nocicepção induzida pelo cinamaldeído, quando comparado com o grupo que recebeu veículo.

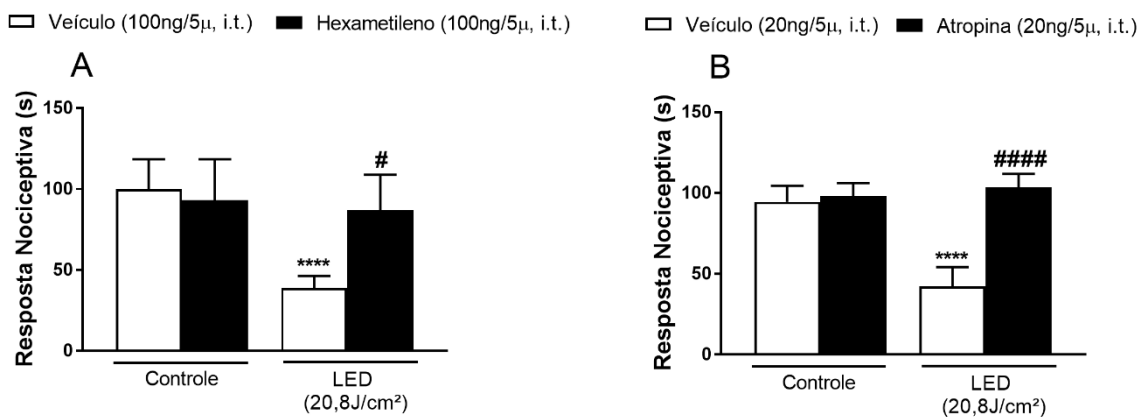
Figura 25 – Envolvimento do sistema GABAérgico no efeito antinociceptivo do LED (890nm; 20,8J/cm²) - Efeito da pré-administração de bicuculina (0,5µg/i.t) (A) ou faclofeno (5µg/i.t) (B) sobre a atividade antinociceptiva do LED. ****p<0,0001 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo controle não tratado, respectivamente. ###p<0,001, ##p<0,01 indicam diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo tratado com bicuculina + LED ou o grupo tratado com faclofeno + LED, respectivamente. Os dados são expressos como a média ± EPM, (n = 8-10 animais). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.



6.7 Envolvimento do sistema Colinérgico

Os resultados apresentados na Figura 26 demonstram que o tratamento com o LED reduziu a nocicepção causada pelo cinamaldeído em camundongos ($p < 0,001$) e que tal efeito foi prevenido pelo pré-tratamento dos animais com a hexametileno (100ng/i.t) ($p < 0,05$) e atropina (20ng/i.t) ($p < 0,0001$). A administração de hexametileno e atropina não causou nenhum efeito “per se” na nocicepção induzida pelo cinamaldeído, quando comparado com o grupo que recebeu veículo.

Figura 26 – Envolvimento do sistema colinérgico no efeito antinociceptivo do LED (890nm; 20,8J/cm²) - Efeito da pré-administração de hexametileno (100ng/i.t) (A) e atropina (20ng/i.t) (B) sobre a atividade antinociceptiva do LED. ****p<0,0001 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo controle não tratado, respectivamente. #p<0,05 e #####p<0,0001 indicam diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo tratado com hexametileno + LED ou o grupo tratado com atropina + LED, respectivamente. Os dados são expressos como a média ± EPM, (n = 8-10 animais). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.



6.8 Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm²) na quantificação de c-Fos no corno dorsal da medula espinal dorsal de camundongos

Em relação a imunohistoquímica e imunofluorescência para c-Fos (Fig. 27 e 28), o cinamaldeído promoveu um aumento na expressão da proteína c-Fos (p<0,0001) e este aumento foi atenuado pelo tratamento com o LED no corno dorsal da medula espinal (p<0,0001).

Figura 27 - Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm²) na quantificação de c-Fos no corno dorsal da medula espinal dorsal de camundongos. Fotomicrografias representativas da imunistoquímica em diferentes grupos experimentais. (A) representa o grupo “naive”, (B) representa células imunorreativas após injeção intraplantar de cinamaldeído (C) representa o efeito do LED para a expressão de c-Fos após injeção de cinamaldeído na pata de camundongos. Número de células imunorreativas para c-Fos no corno dorsal da medula espinal (D). ##### $p < 0,001$ indica diferença significativa entre o grupo naive e o grupo cinamaldeído. **** $p < 0,0001$ indica diferença significativa entre o grupo cinamaldeído e o grupo cinamaldeído + LED. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.

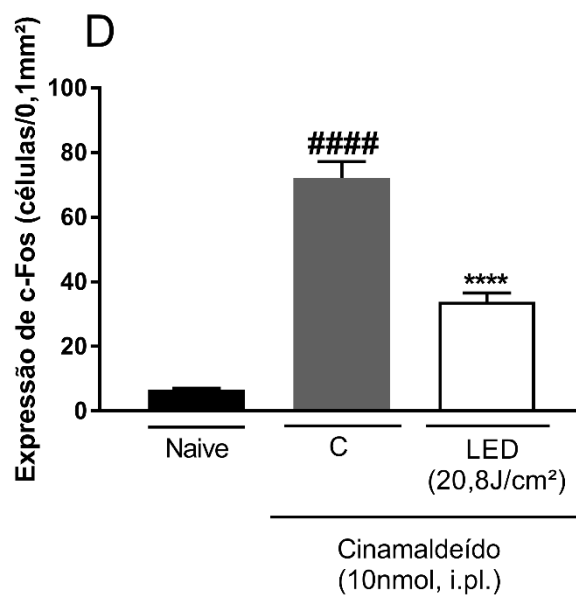
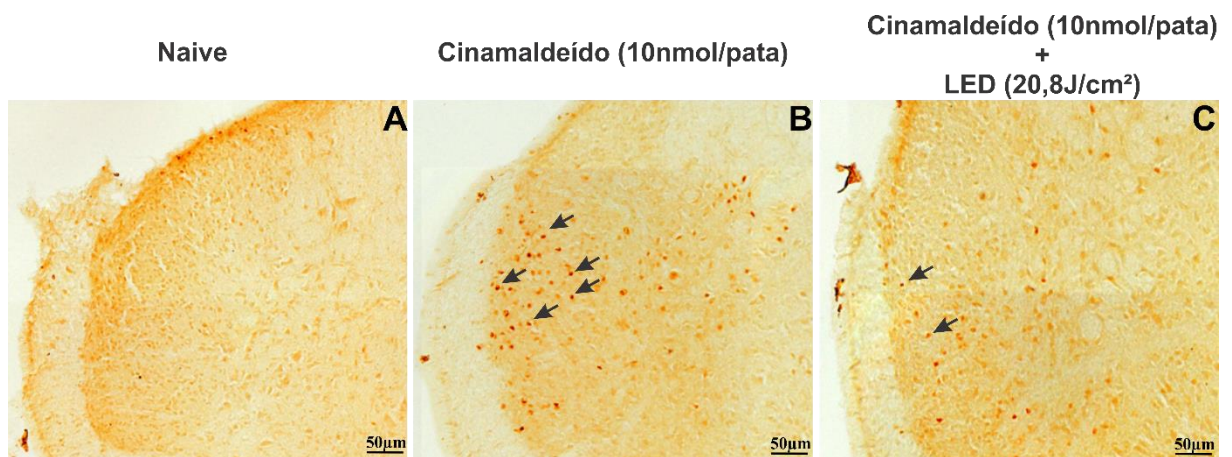
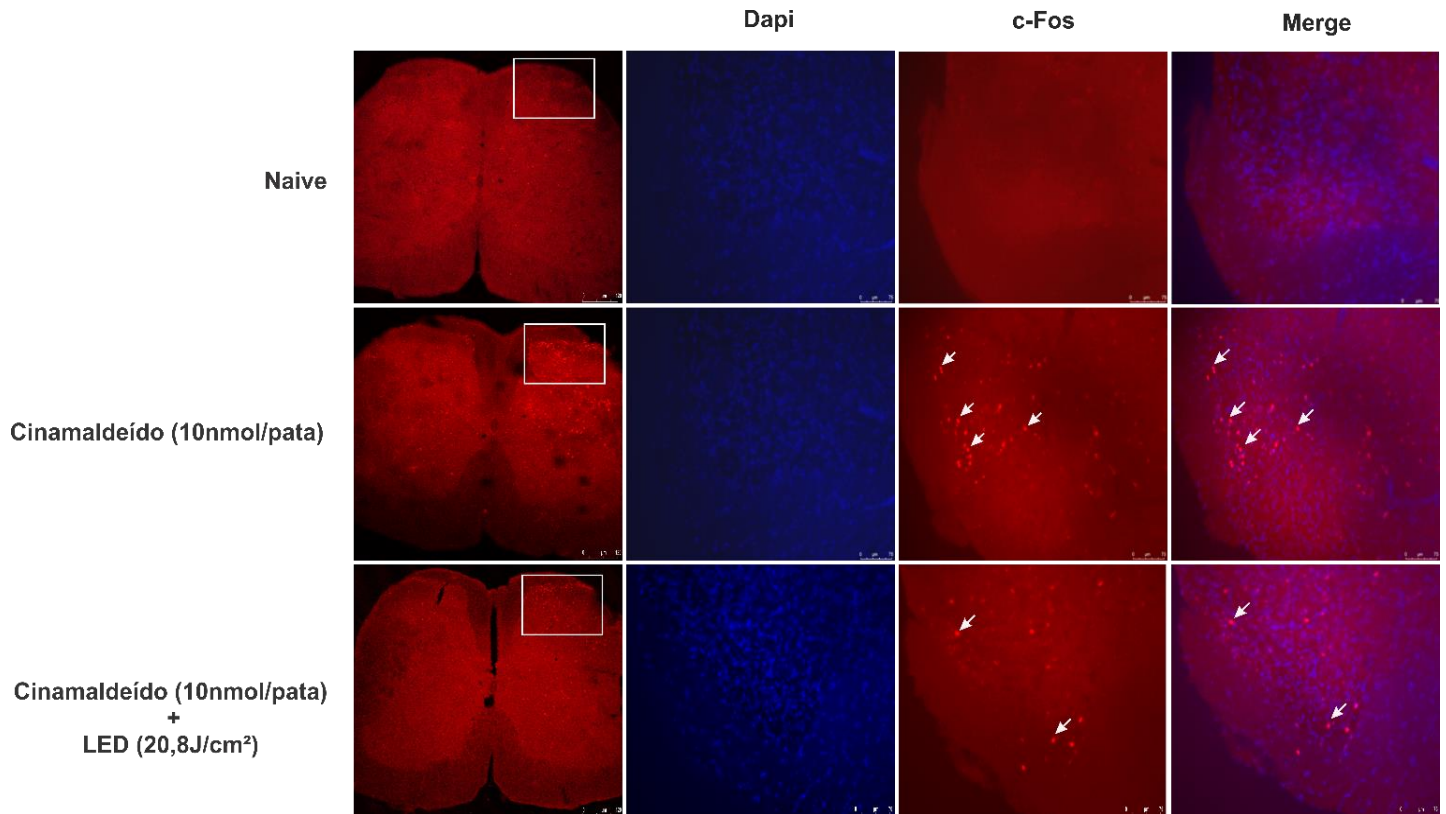


Figura 28 – Figuras representativas do efeito do LED (890nm; 20,8J/cm²) na quantificação de c-Fos no corno dorsal da medula espinal dorsal de camundongos.

Fotomicrografias de cortes transversais do corno dorsal da medula espinal que demonstram o efeito do LED para a expressão de c-Fos após injeção de cinamaldeído na pata de camundongos nos diferentes grupos experimentais

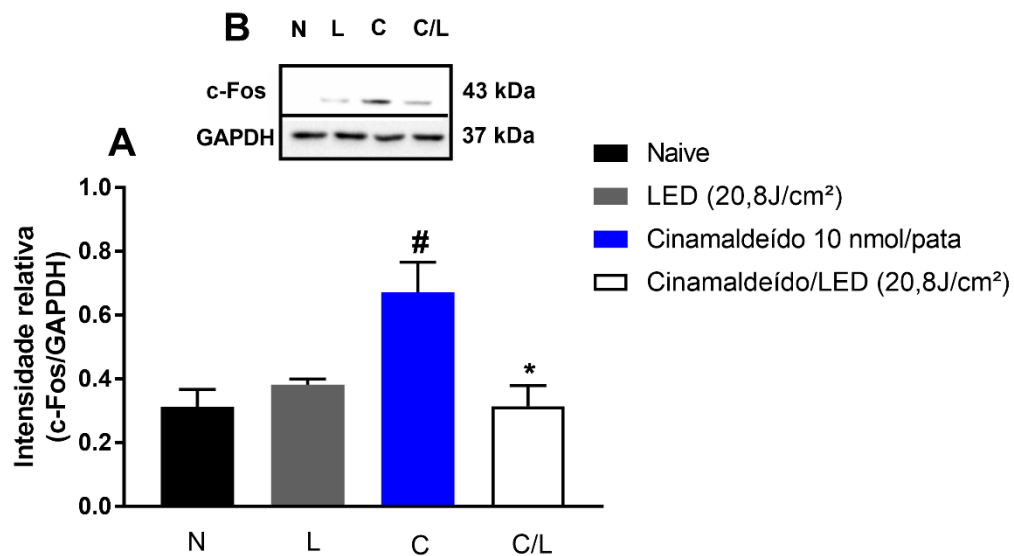


6.9 Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm²) na quantificação da expressão proteica de c-Fos por Western Blotting no corno dorsal da medula espinal de camundongos

Em relação a expressão proteica para c-Fos (Fig. 29), o cinamaldeído promoveu um aumento na expressão da proteína c-Fos ($p < 0,0001$) e este aumento foi atenuado pelo tratamento com o LED no corno dorsal da medula espinal ($p < 0,0001$).

Figura 29 - Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm²) na expressão proteica de c-Fos no corno dorsal da medula espinal dorsal de camundongos.

Expressão proteica em segmentos do corno dorsal da medula espinal de camundongos 1 hora após a injeção de cinamaldeído na pata. A expressão proteica foi normalizada em relação à expressão de GAPDH. **(A)** Quantificação da expressão proteica de c-Fos. **(B)** Membrana representativa da expressão proteica de c-Fos. ##### $p < 0,001$ indica diferença significativa entre o grupo naive e o grupo cinamaldeído. **** $p < 0,0001$ indica diferença significativa entre o grupo cinamaldeído e o grupo cinamaldeído + LED. Os dados são expressos como a média \pm EPM, (n=6 animais/grupo). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.



6.10 Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm²) na quantificação de c-Fos na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral e dorsolateral, “locus coeruleus” e núcleo magno da rafe de camundongos

Em relação a imunistoquímica para c-Fos, o tratamento somente com o LED e com estímulo nocivo mais o LED promoveram um aumento na expressão da proteína c-Fos na vIPAG, dIPAG (Fig. 30 e 31), “locus coeruleus” (Fig. 32 e 33) e RMg (Fig. 34 e 35).

Figura 30 - Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm²) na quantificação de c-Fos na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral e dorsolateral de camundongos. Fotomicrografias de secções transversais da substância cinzenta periaquedutal ventrolateral (vIPAG) (A-D), dorsolateral (dIPAG) (F-I) mostradas por imunohistoquímica para a expressão de c-Fos após injeção de cinamaldeído na pata de camundongos. Gráficos ilustram a quantificação da expressão de c-Fos na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral vIPAG (E), dorsolateral dIPAG (J). ^ap<0,01 indica diferença significativa entre o grupo naive e o grupo cinamaldeído. ###p<0,001 indica diferença significativa entre o grupo naive e o grupo tratado somente com LED. ****p<0,0001 indica diferença significativa entre tratado com LED com injeção de cinamaldeído em relação a todos os outros grupos. Os dados são expressos como a média ± EPM, (n=6 animais/grupo). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.

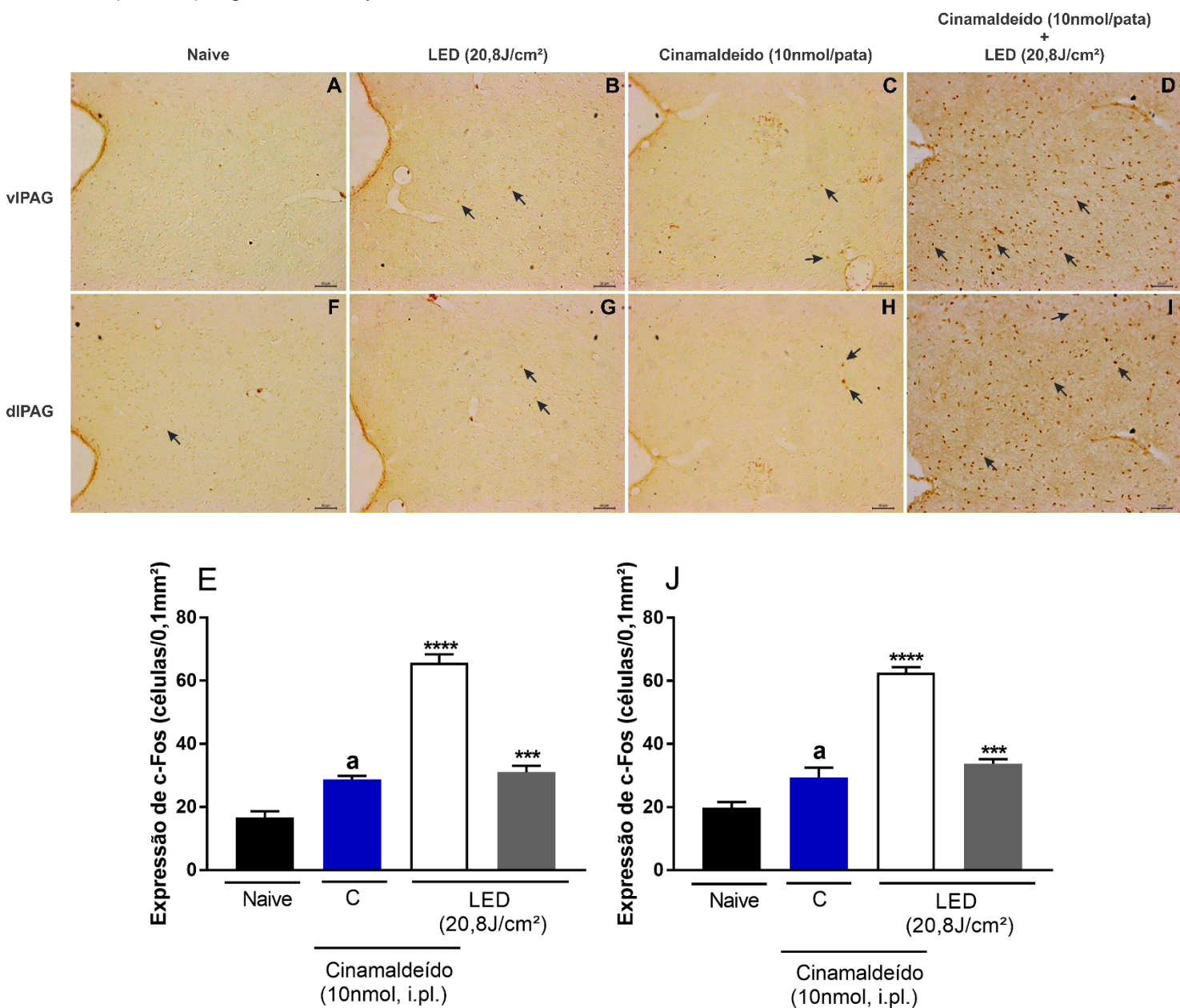
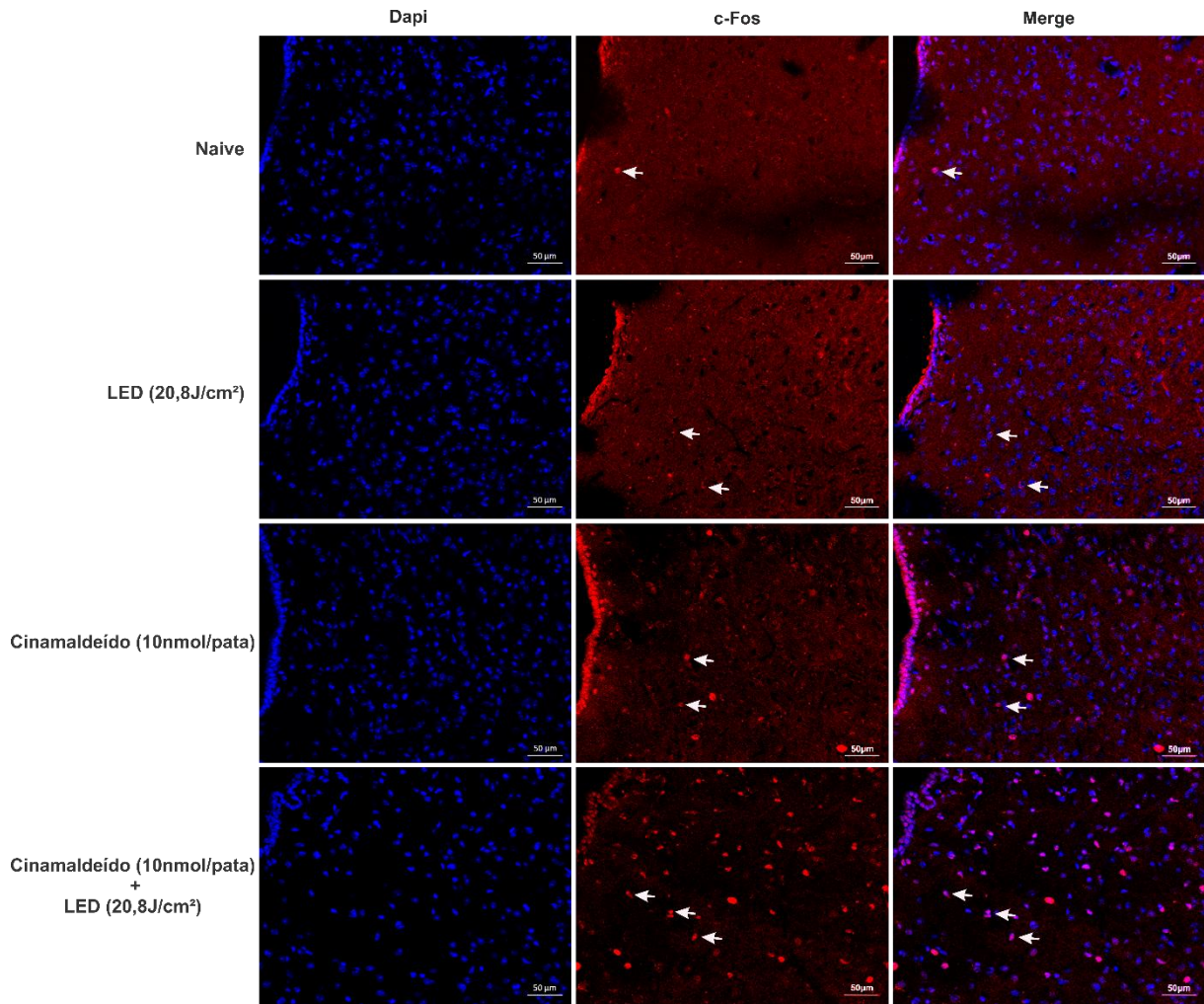


Figura 31 - Figuras representativas do efeito do LED (890nm; 20,8J/cm²) na quantificação de c-Fos na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral e dorsolateral de camundongos.

Fotomicrografias de secções transversais da substância cinzenta periaquedutal ventrolateral (vIPAG) e dorsolateral (dIPAG), respectivamente, mostradas por imunofluorescência para a expressão de c-Fos após injeção de cinamaldeído na pata de camundongos.



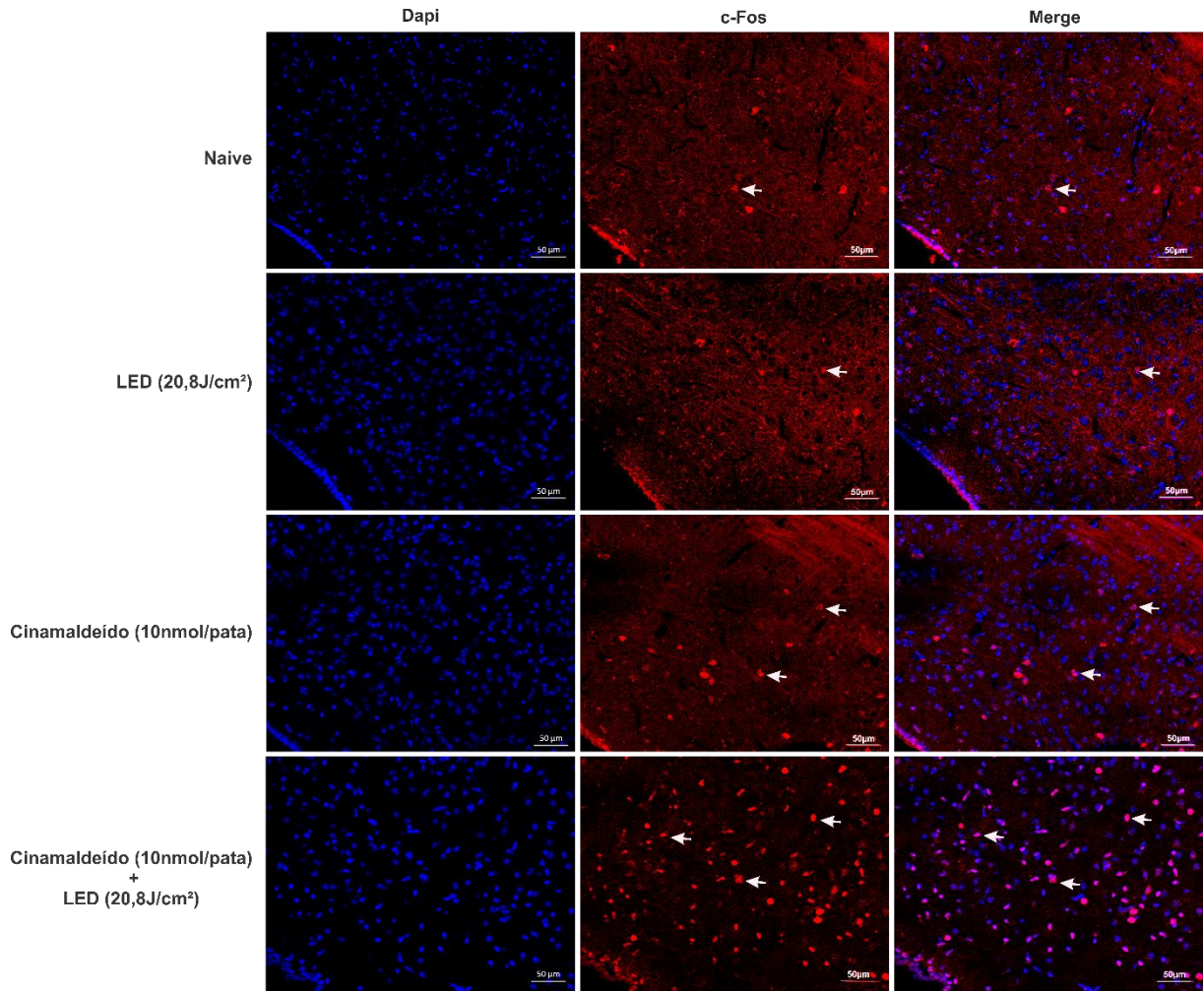


Figura 32 - Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm²) na quantificação de c-Fos no “locus coeruleus” de camundongos. Fotomicrografias de secções transversais do “locus coeruleus” (A-D) mostradas por imunoistoquímica para a expressão de c-Fos após injeção de cinamaldeído na pata de camundongos. Gráfico que ilustram a quantificação da expressão de c-Fos no “locus coeruleus” (E). #####p<0,01, indica diferença significativa entre o grupo tratado somente com o LED e os grupos naive e cinamaldeído; ****p<0,0001 indica diferença significativa entre o grupo tratado com o LED com injeção de cinamaldeído em relação a todos os outros grupos. Os dados são expressos como a média ± EPM, (n=6 animais/grupo). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.

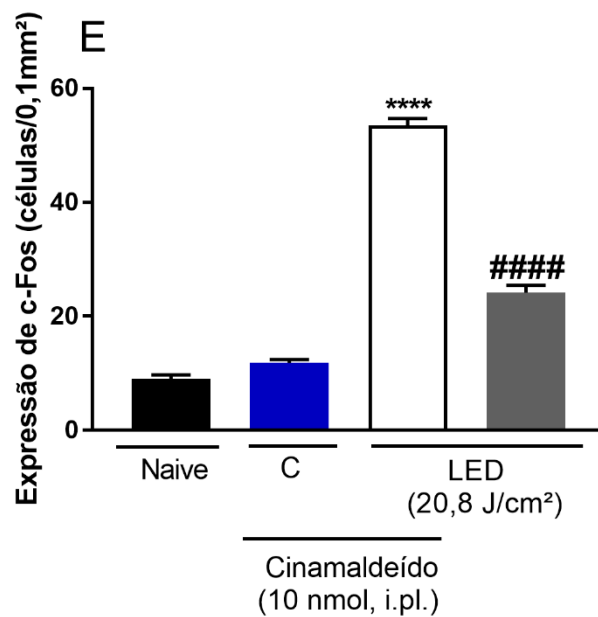
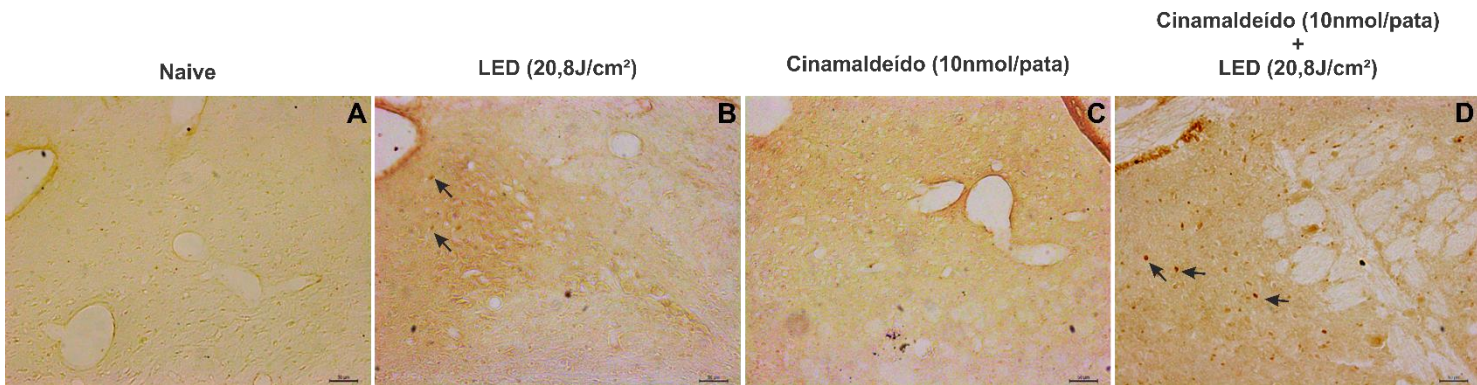


Figura 33 - Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm²) na quantificação de c-Fos no “locus coeruleus” de camundongos. Fotomicrografias de secções transversais do “locus coeruleus” (LC) mostradas por imunofluorescência para a expressão de c-Fos após injeção de cinamaldeído na pata de camundongos.

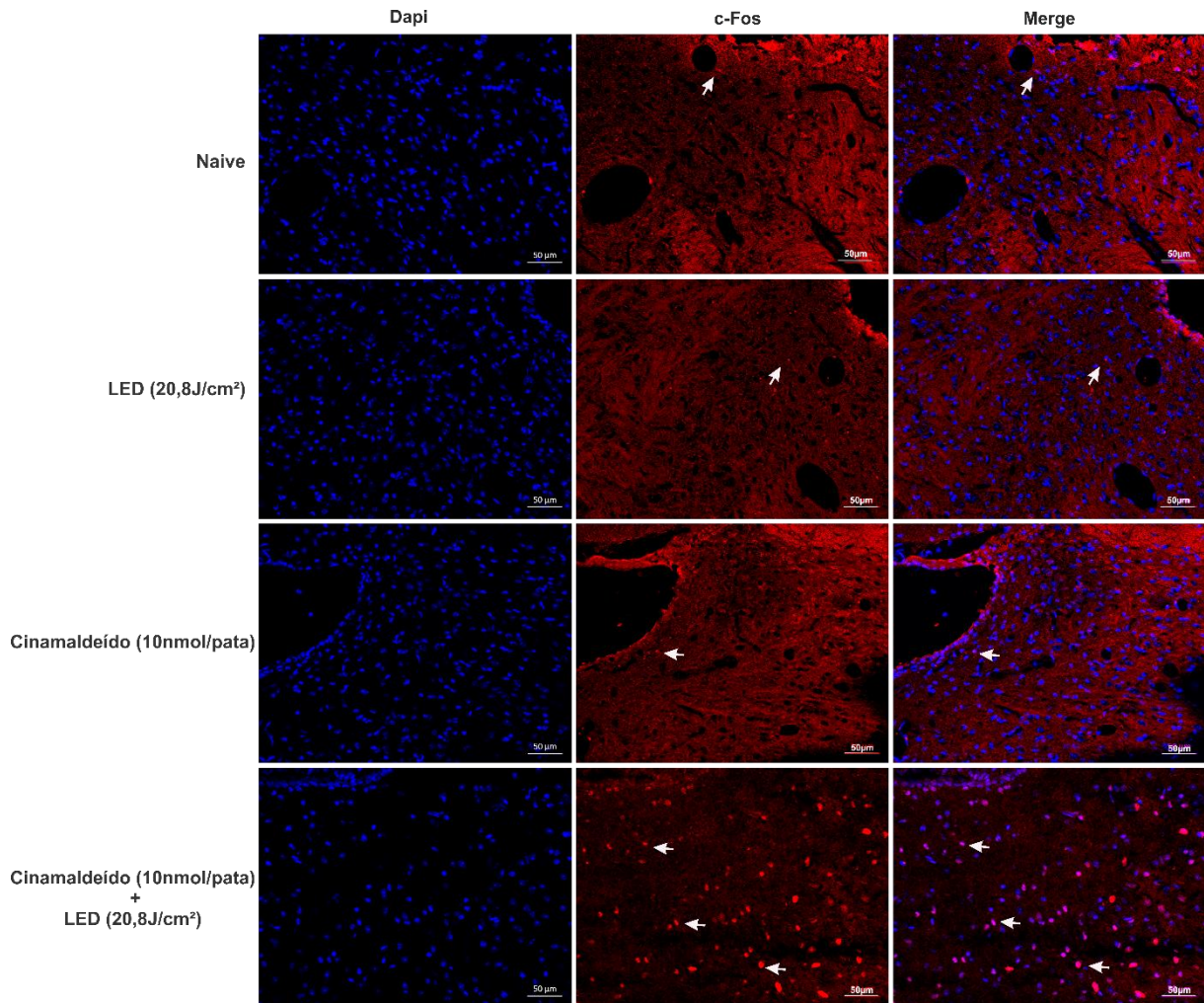


Figura 34 - Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm²) na quantificação de c-Fos no núcleo magno da rafe de camundongos. Fotomicrografias de secções transversais do núcleo magno da rafe (A-D) mostradas por imunistoquímica para a expressão de c-Fos após injeção de cinamaldeído na pata de camundongos. Gráfico que ilustra a quantificação da expressão de c-Fos no núcleo magno da rafe (E). #####p<0,0001 indica diferença significativa entre o grupo tratado somente com o LED e os grupos naive e cinamaldeído. ****p<0,0001 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED com injeção de cinamaldeído em relação a todos os outros grupos. Dados representados como a média (n=6 animais/grupo). Os dados são expressos como a média ± EPM, (n=6 animais/grupo). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.

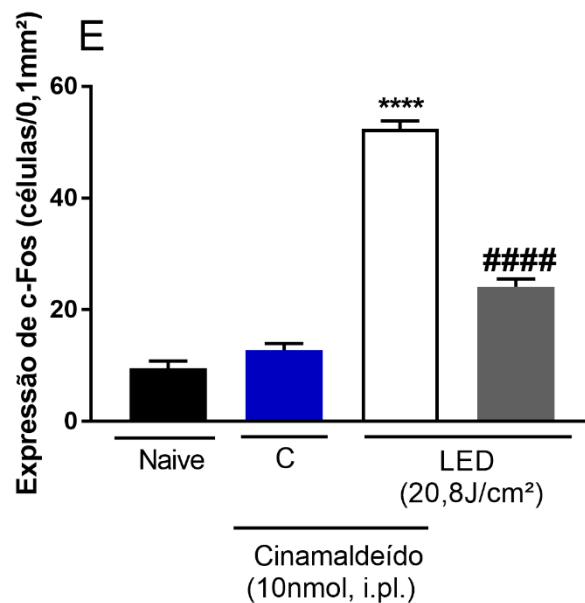
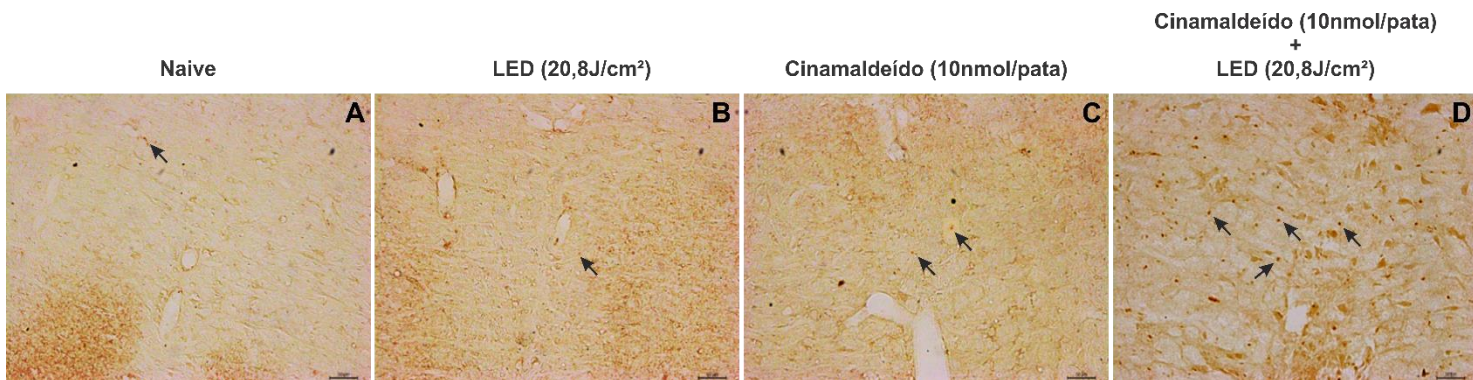
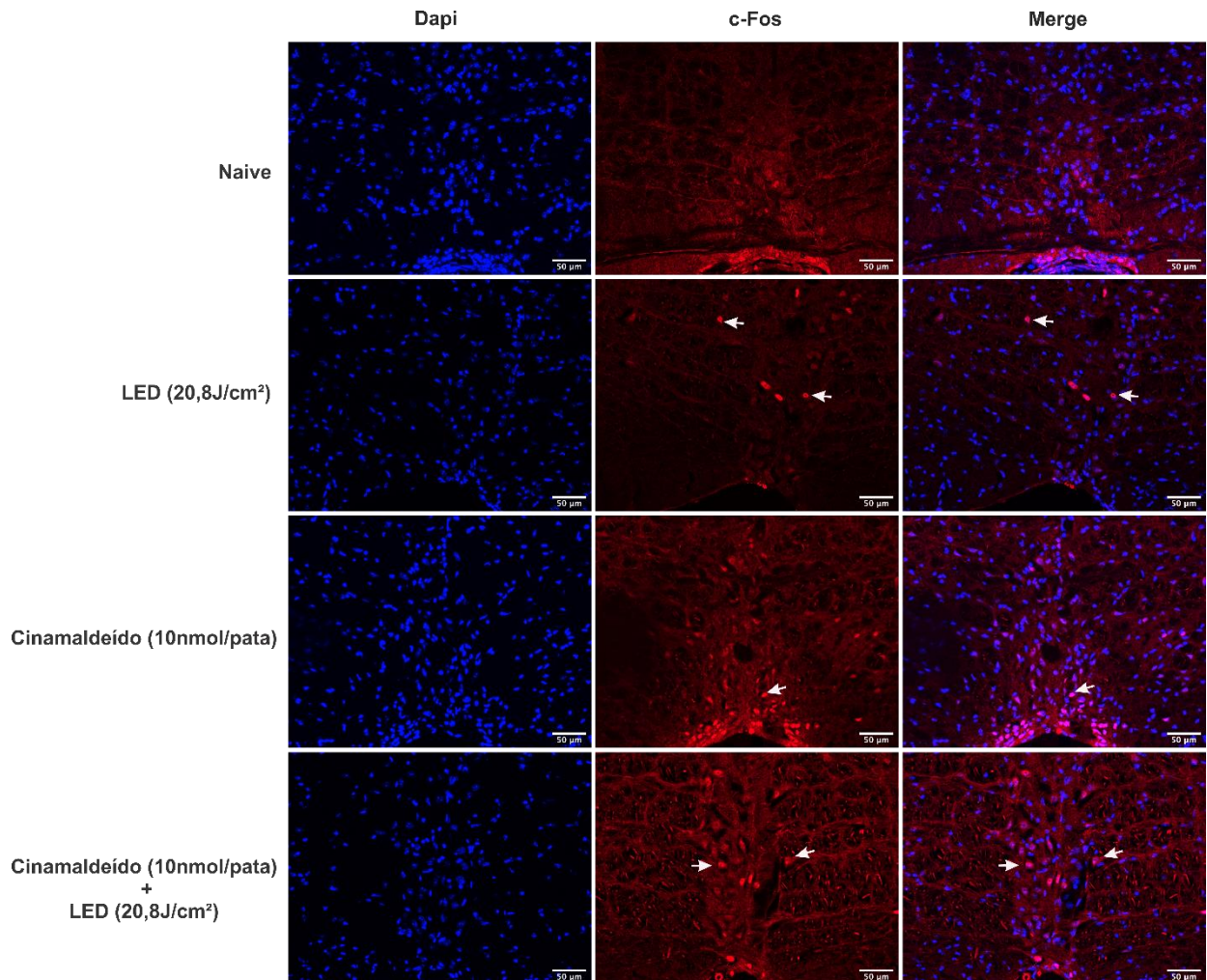


Figura 35 - Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm²) na quantificação de c-Fos no núcleo magno da rafe de camundongos. Fotomicrografias de secções transversais do núcleo magno da rafe mostradas por imunofluorescência para a expressão de c-Fos após injeção de cinamaldeído na pata de camundongos.



6.11 Envolvimento do sistema monoaminérgico

A administração intratecal de 6-OHDA (20µg/i.t.), DSP-4 (20µg/i.t.) e 5,7-DHT (50µg/i.t.) 3 dias antes, produziu uma nocicepção significativa no teste da placa quente ($p < 0,01$) (Fig. 36, 37, e 47). O tratamento com LED reduziu a nocicepção no teste do cinamaldeído ($p < 0,01$) e placa quente em camundongos ($p < 0,05$) e tal efeito foi prevenido pelo pré-tratamento dos animais com 6-OHDA, DSP-4 e 5,7-DHT no teste do cinamaldeído ($p < 0,001$, $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) e na placa quente ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente) (Fig. 36, 37, e 46). As figuras representativas no corno dorsal da medula espinal e “locus coeruleus” após as lesões com 6-OHDA e DSP-4, seguem logo abaixo dos resultados comportamentais referentes ao DSP-4. Da mesma forma, as figuras representativas no núcleo magno

da rafe após a lesão com 5,7-DHT segue logo abaixo aos seus respectivos testes comportamentais.

Figura 36 - A administração intratecal de 6-OHDA (20µg/i.t.) reduz o efeito antinociceptivo do LED (890nm; 20,8J/cm²) no teste do cinamaldeído (A) e placa quente (B). (A) ***p<0,001 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo controle não tratado, respectivamente. ####p<0,0001 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo LED + 6-OHDA, respectivamente. ^ap<0,01 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo 6-OHDA, respectivamente. (B). *p<0,05 indica diferença significativa antes e após o tratamento com o LEDT, respectivamente. ####p<0,0001 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo tratado com LED + 6-OHDA, respectivamente. ^ap<0,0001 indica diferença significativa entre o grupo antes do tratamento com LED e o grupo 6-OHDA, respectivamente. ^bp<0,01 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo 6-OHDA, respectivamente. Os dados são expressos como a média ± EPM, (n = 6 animais/grupo). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.

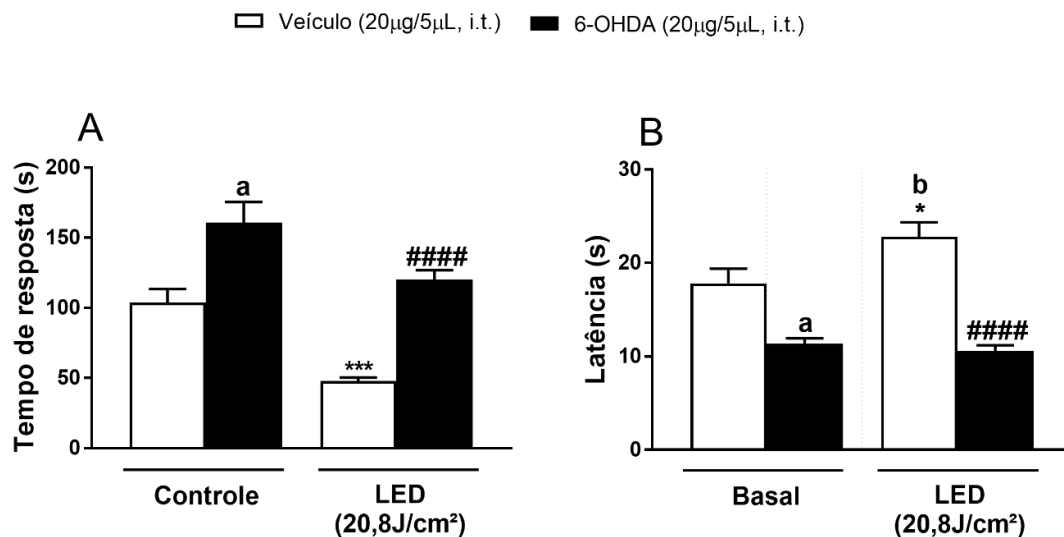


Figura 37 - A administração intratecal de DSP-4 (20µg/i.t.) reduz o efeito antinociceptivo do LED (890nm; 20,8J/cm²) no teste do cinamaldeído (A) e placa quente (B). (A) ***p<0,001 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo controle não tratado, respectivamente. #####p<0,0001 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo tratado com LED + DSP-4, respectivamente. (B). *p<0,05 indica diferença significativa entre o grupo antes e após o tratamento com o LED, respectivamente. #####p<0,0001 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo tratado com LED + DSP-4, respectivamente. ^ap<0,001 indica diferença significativa entre o grupo sem tratamento com LED e o grupo DSP-4, respectivamente. Os dados são expressos como a média ± EPM, (n = 6 animais/grupo). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.

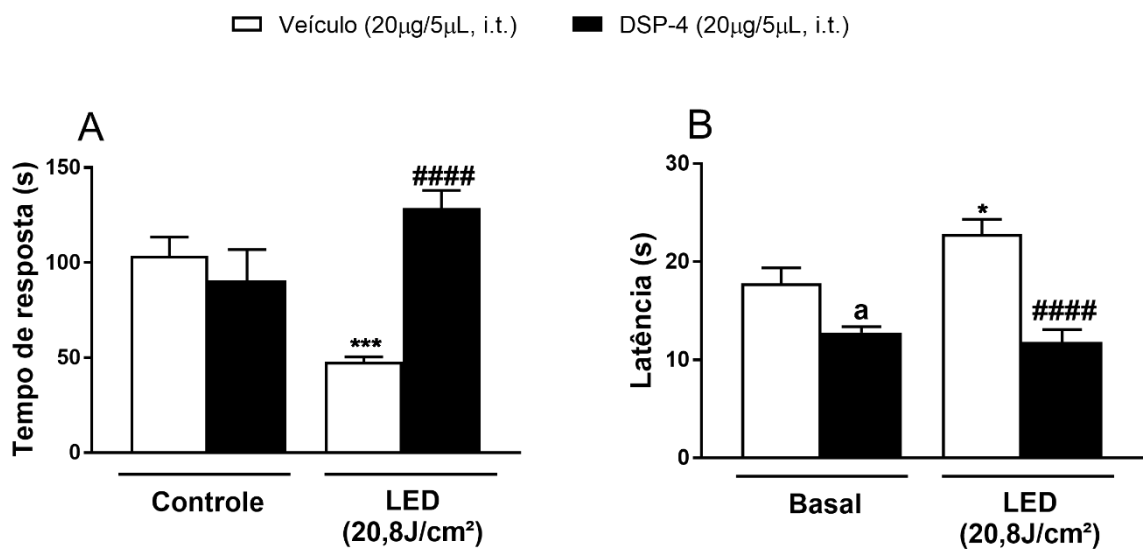


Figura 38 - Figuras representativas de fibras imunorreativas para tirosina hidroxilase (TH) e dopamina β -hidroxilase (D β H) no corno dorsal da medula espinal.

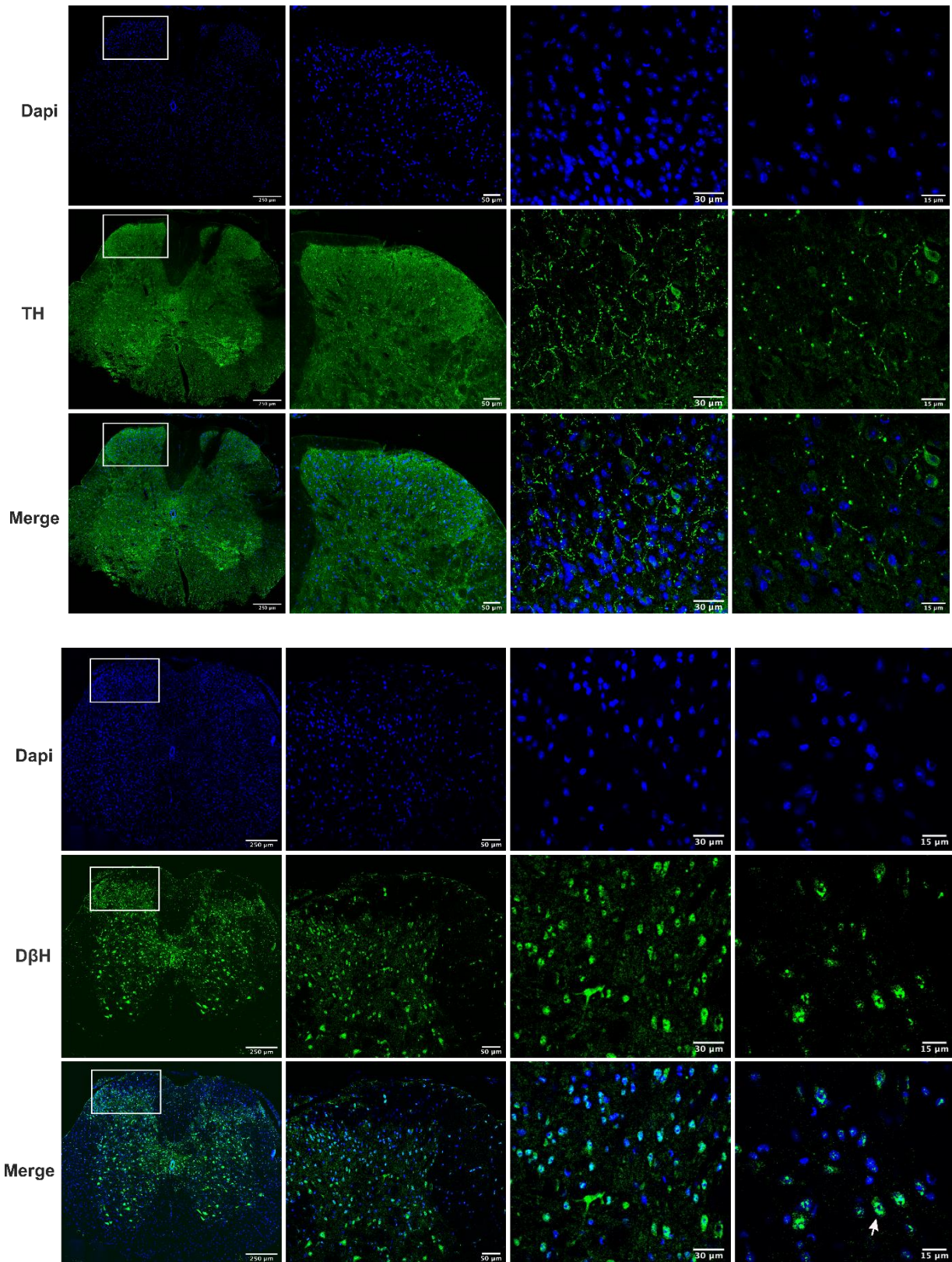


Figura 39 - Figuras representativas de fibras imunorreativas para tirosina hidroxilase (TH) e dopamina β -hidroxilase (D β H) no corno dorsal da medula espinal após administração intratecal de 6-OHDA (20 μ g/i.t.).

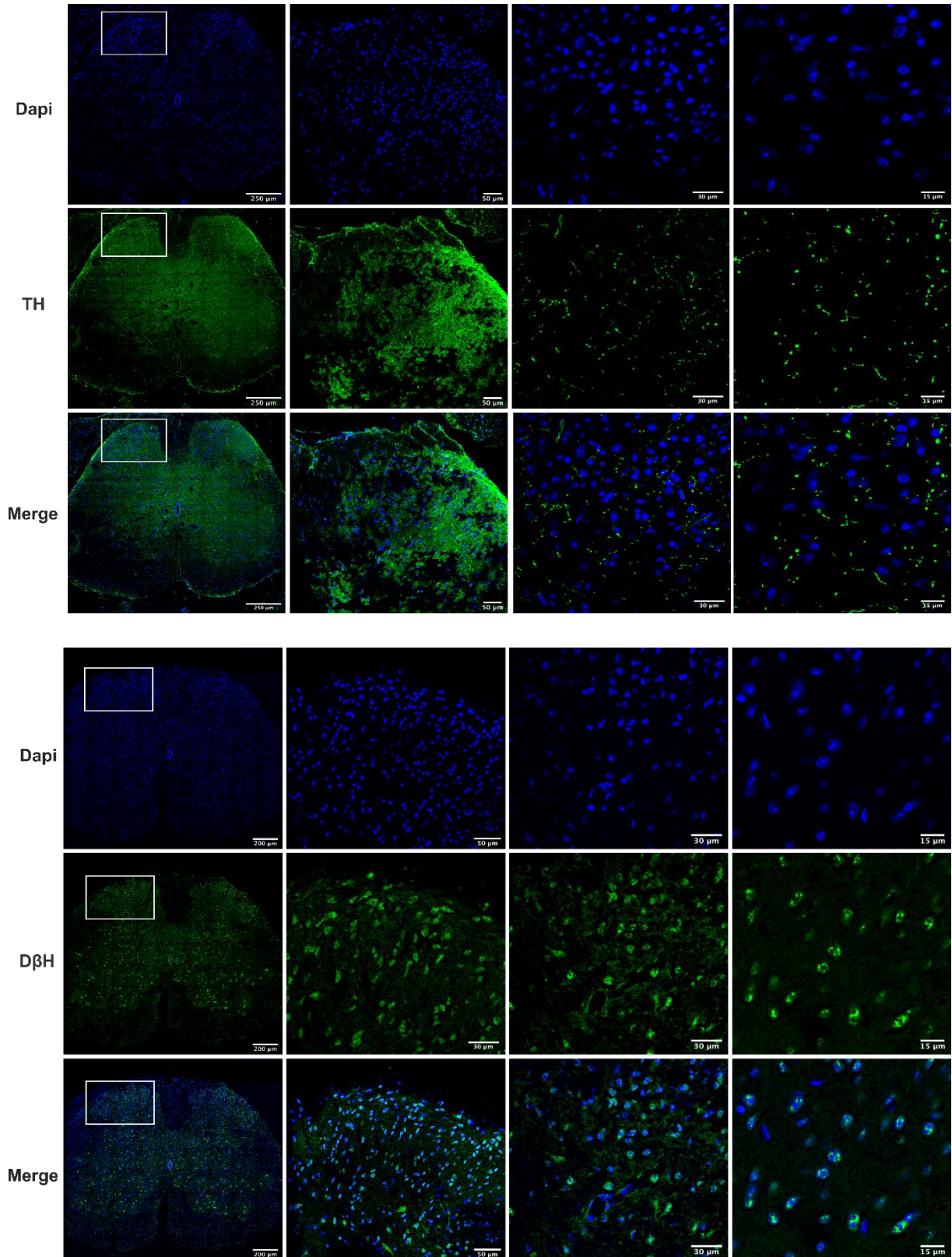


Figura 40 - Figuras representativas de fibras imunorreativas para tirosina hidroxilase (TH) e dopamina β -hidroxilase (D β H) no corno dorsal da medula espinal antes e após administração intratecal de DSP-4 (20 μ g/i.t.).

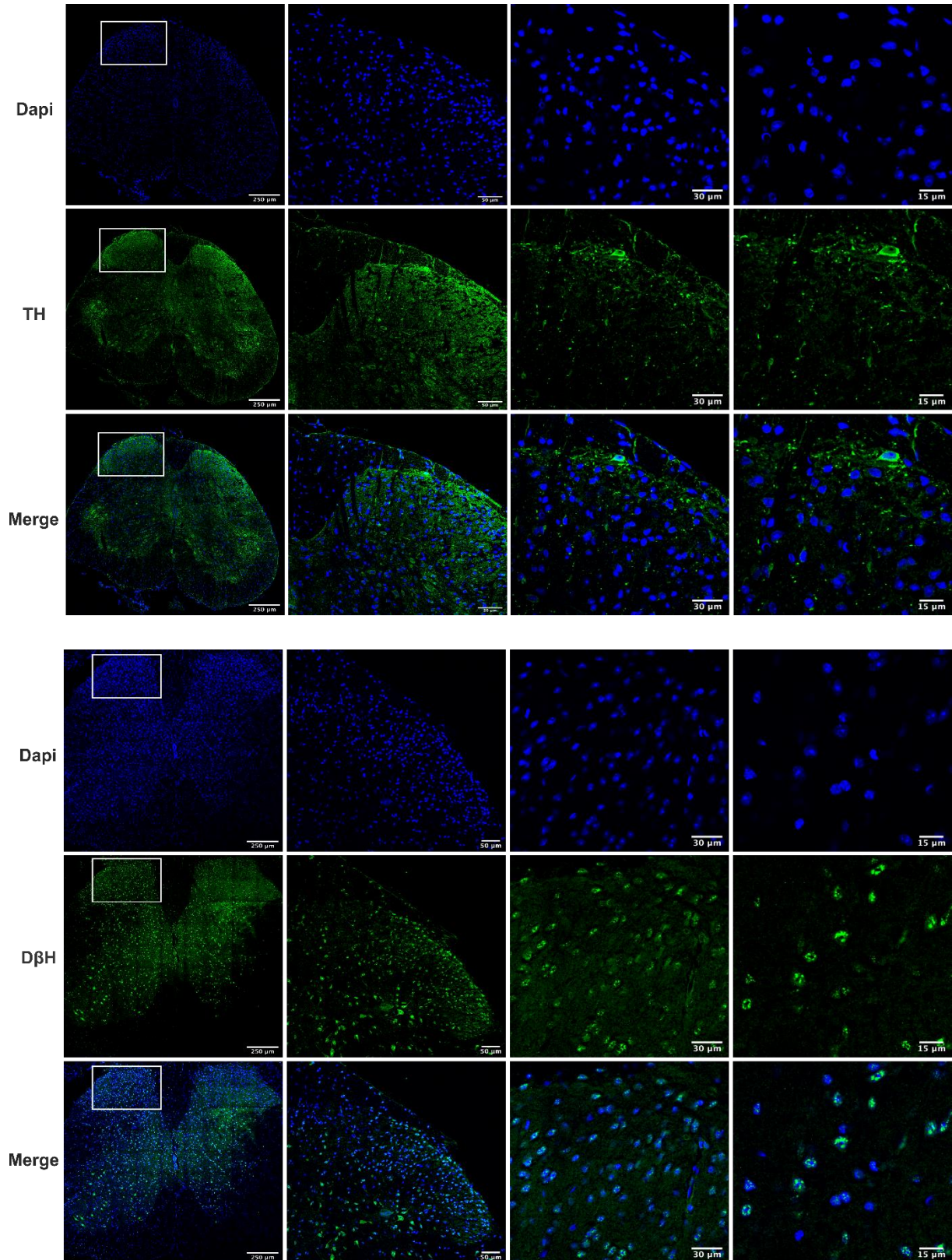


Figura 41 - Figuras representativas de fibras imunorreativas para tirosina hidroxilase (TH) no corno dorsal da medula espinal antes e após administração intratecal de 6-OHDA (20µg/i.t.) e DSP-4 (20µg/i.t.). (A) Grupo controle. (B) Lesão com 6-OHDA (20µg/i.t.) e (C) Lesão com DSP-4 (20µg/i.t.) promoveram uma menor atividade para TH e uma perda de fibras positivas para TH. As pontas de setas indicam fibras positivas para TH.

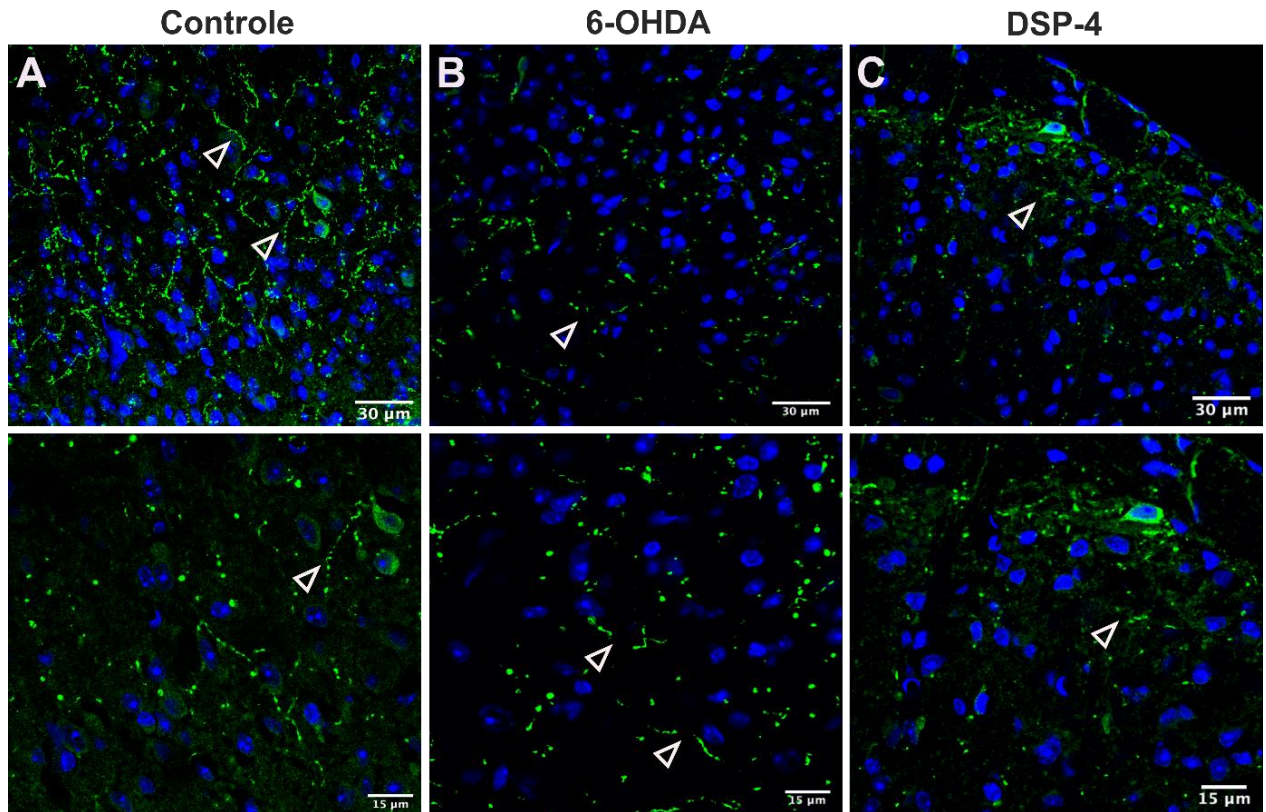


Figura 42 - Figuras representativas de fibras imunorreativas para dopamina β -hidroxilase (D β B) no corno dorsal da medula espinal antes e após administração intratecal de 6-OHDA (20 μ g/i.t.) e DSP-4 (20 μ g/i.t.). (A) Grupo controle. (B) Lesão com 6-OHDA (20 μ g/i.t.) e (C) Lesão com DSP-4 (20 μ g/i.t.) promoveram uma menor atividade para D β B. As setas indicam fibras imunorreativas para D β B.

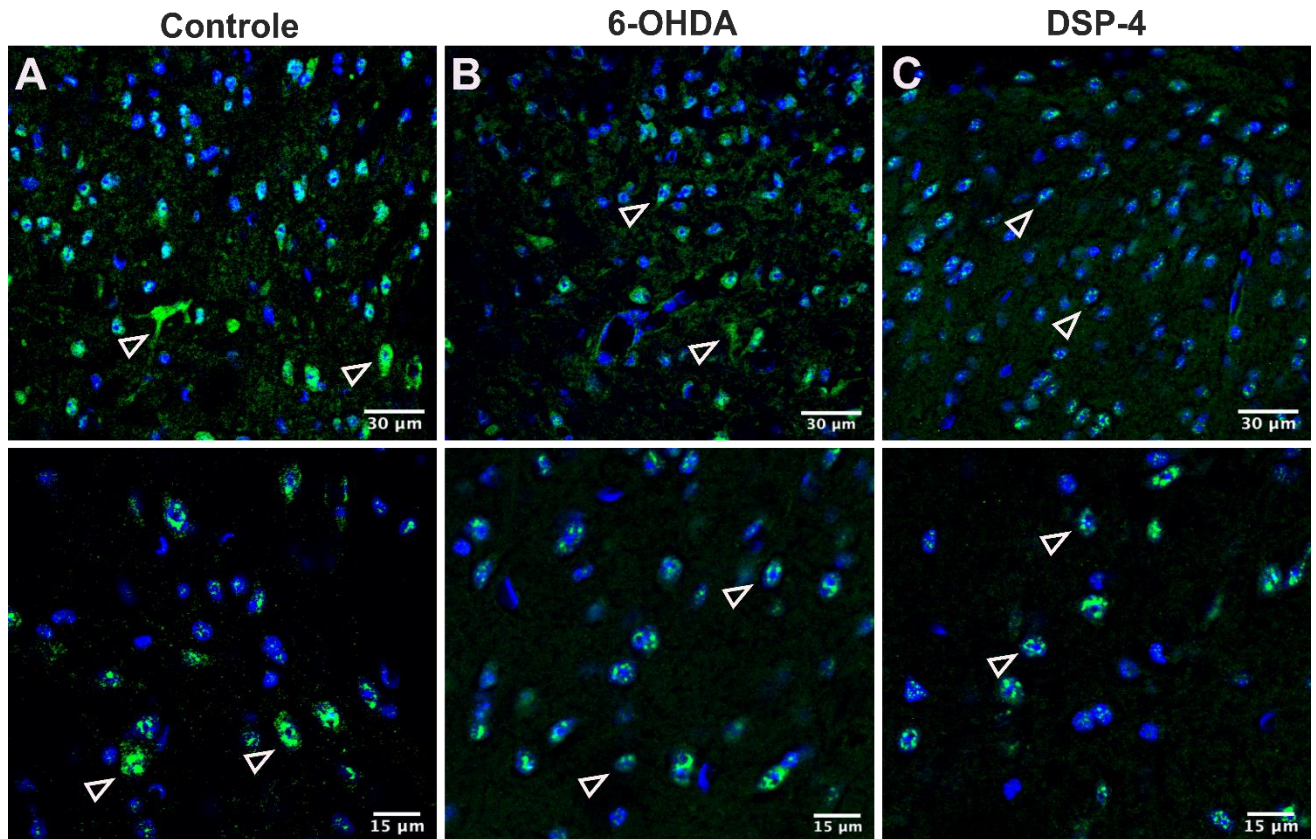


Figura 43 - Figuras representativas de fibras e células imunorreativas para tirosina hidroxilase (TH) no “locus coeruleus” antes e após administração intratecal de 6-OHDA (20µg/i.t.) e DSP-4 (20µg/i.t.).

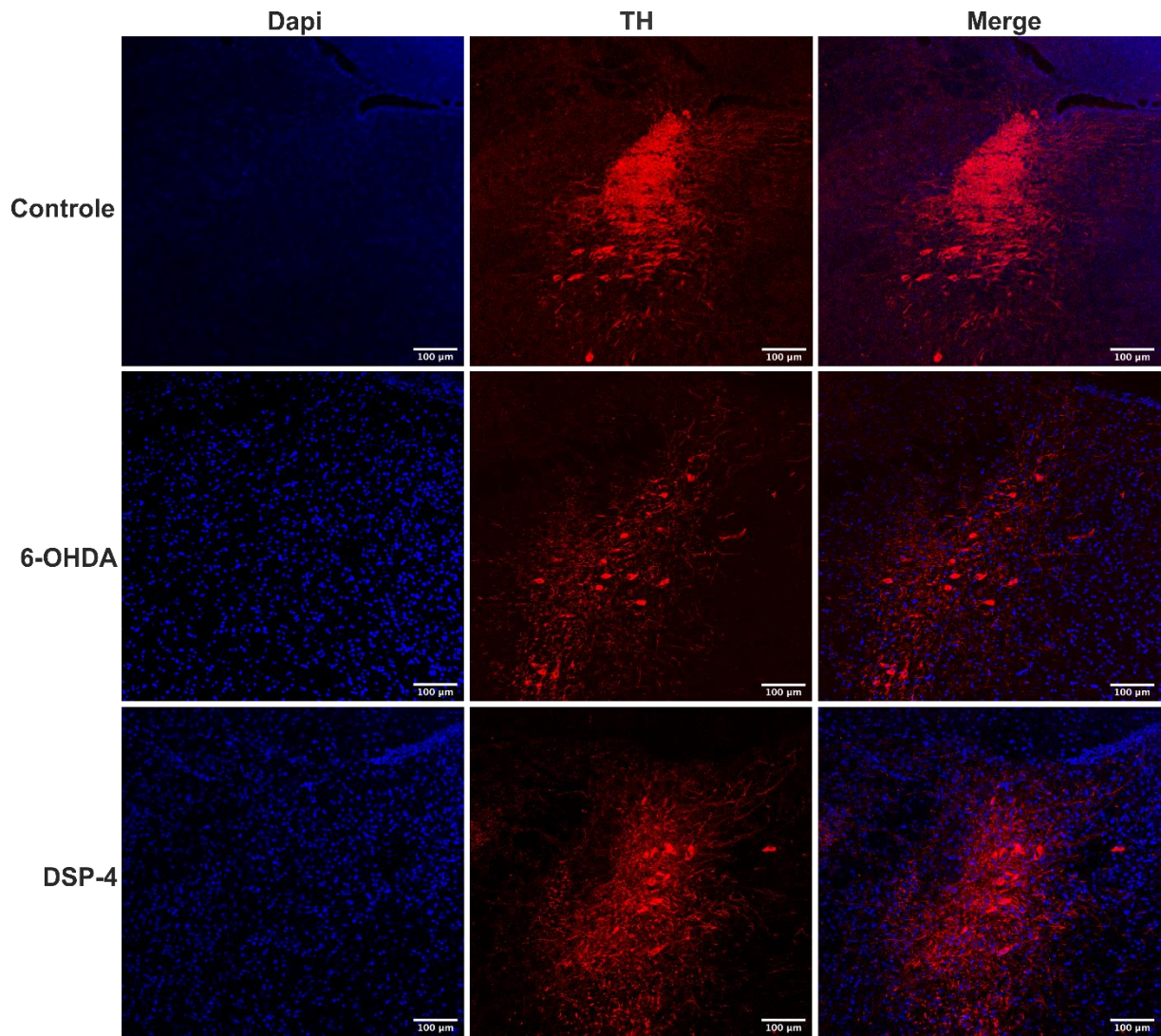


Figura 44 - Figuras representativas de fibras e células imunorreativas para tirosina hidroxilase (TH) no “locus coeruleus” antes e após administração intratecal de 6-OHDA (20µg/i.t.) e DSP-4 (20µg/i.t.). (A) Grupo controle. (B) Lesão com 6-OHDA (20µg/i.t.) e (C) Lesão com DSP-4 (20µg/i.t.) promoveram uma menor atividade para TH e uma perda de fibras positivas para TH. As setas indicam células imunorreativas para TH e as ponta de setas indicam fibras imunorreativas para TH.

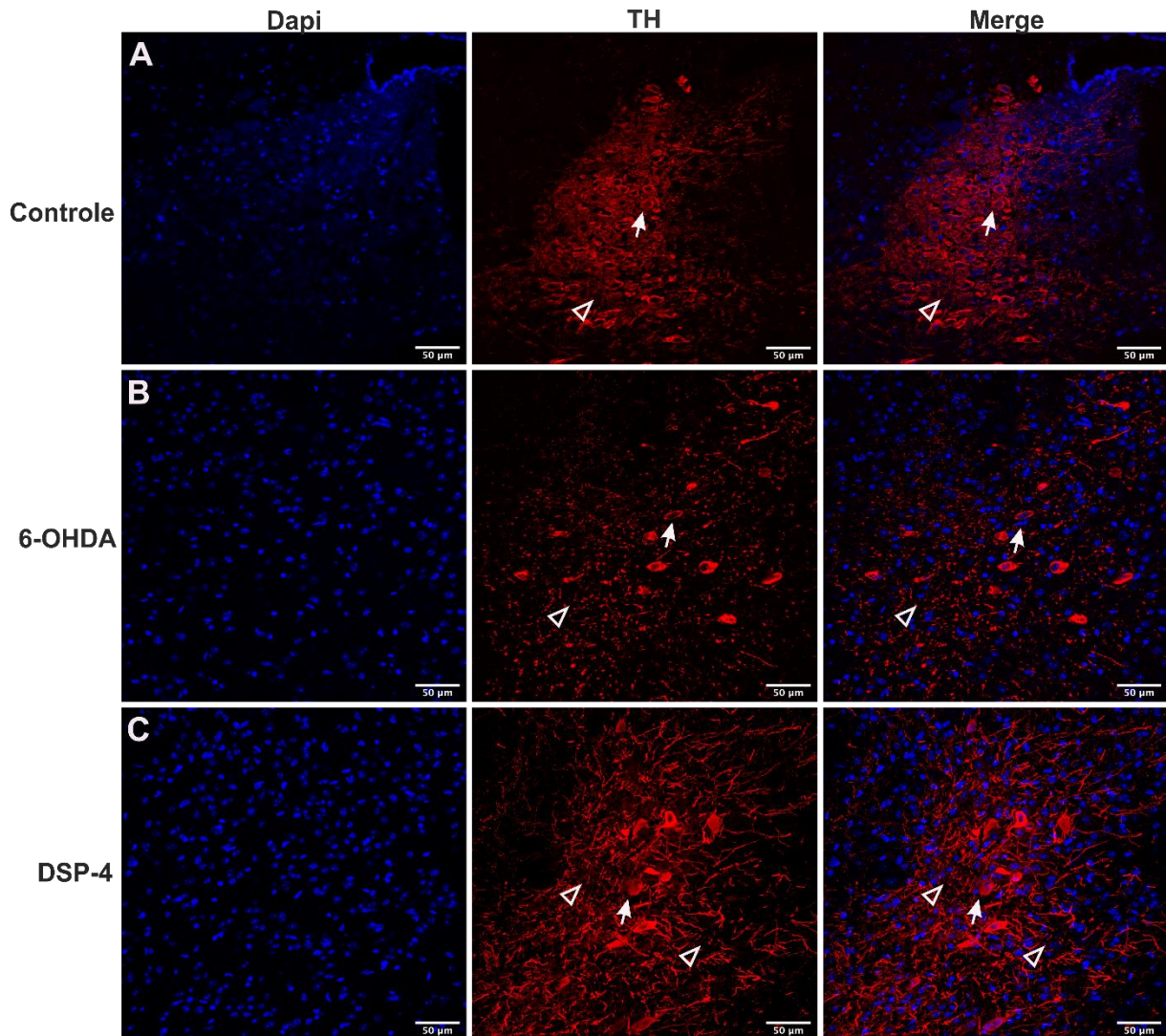


Figura 45 - Figuras representativas de fibras e células imunorreativas para dopamina β -hidroxilase (D β H) no "locus coeruleus" antes e após administração intratecal de 6-OHDA (20 μ g/i.t.) e DSP-4 (20 μ g/i.t.).

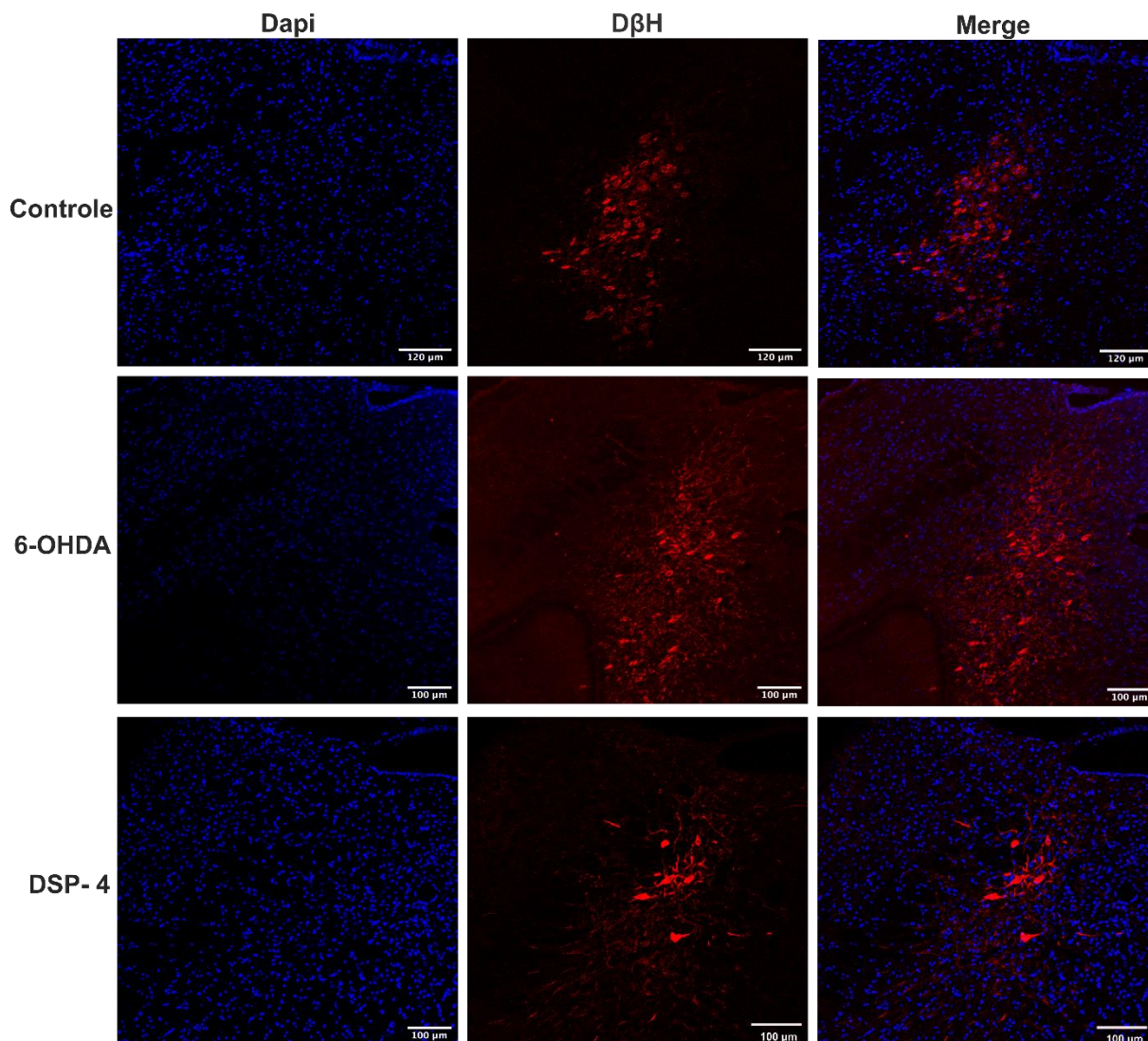


Figura 46 - Figuras representativas de fibras e neurônios imunorreativos para dopamina β -hidroxilase (D β H) no "locus coeruleus" antes e após administração intratecal de 6-OHDA (20 μ g/i.t.) e DSP-4 (20 μ g/i.t.). (A) Grupo controle. (B) Lesão com 6-OHDA (20 μ g/i.t.) e (C) Lesão com DSP-4 (20 μ g/i.t.) promoveram uma menor atividade para D β H e uma perda de fibras positivas para D β H. As setas indicam células imunorreativas para D β H e as ponta de setas indicam fibras imunorreativas para D β H.

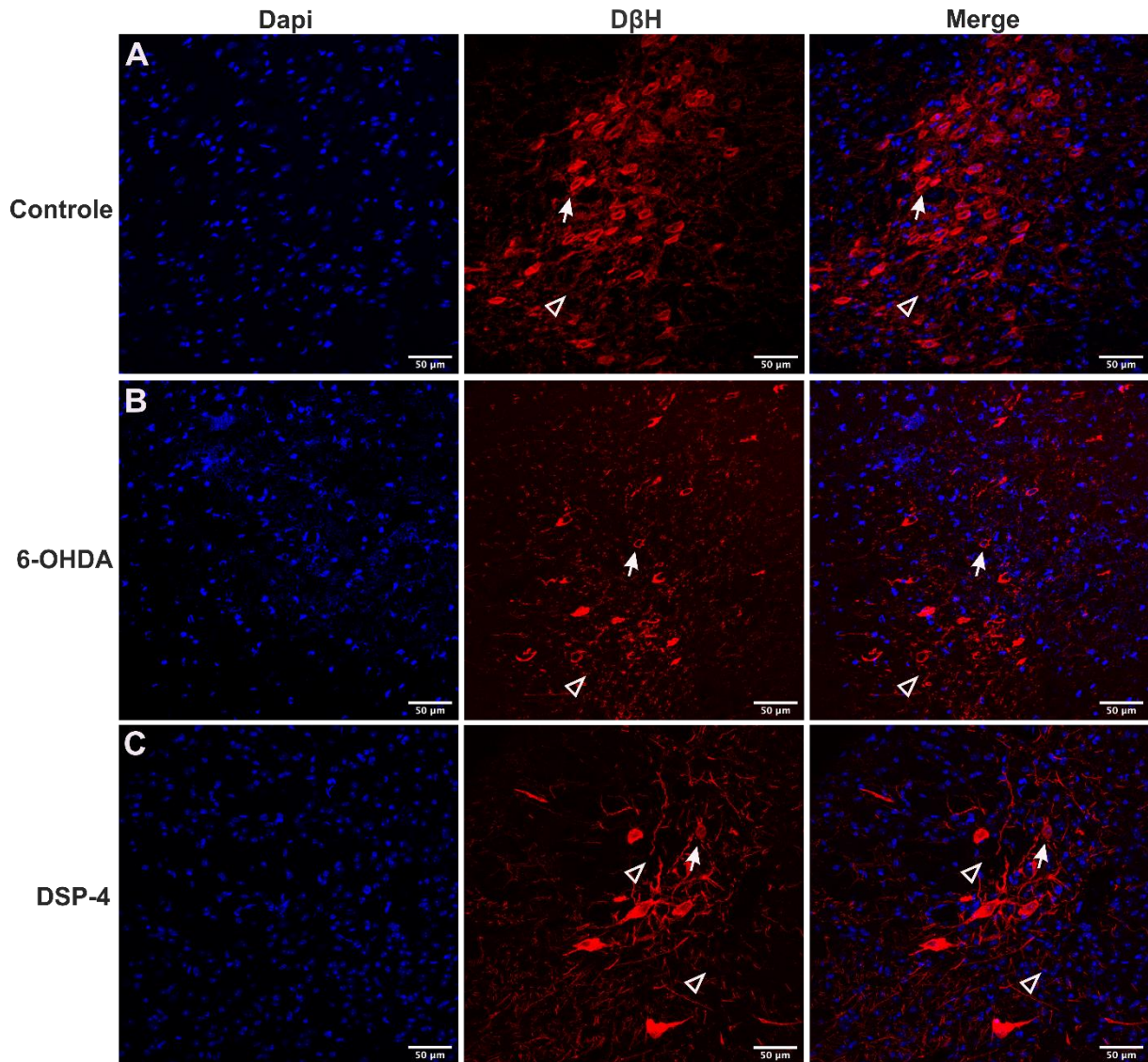


Figura 47 - A administração intratecal de 5,7-DHT (50µg/i.t.) reduz o efeito antinociceptivo do LED (890nm; 20,8J/cm²) no teste do cinamaldeído (A) e placa quente (B). (A) ***p<0,001 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo controle não tratado, respectivamente. #p<0,05 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo tratado com LED + 5,7-DHT, respectivamente. (B). *p<0,05 indica diferença significativa entre o grupo antes e após o tratamento com o LED, respectivamente. ####p<0,0001 indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo tratado com LED + 5,7-DHT, respectivamente. ^ap<0,001 indica diferença significativa entre o grupo sem tratamento com LED e o grupo 5,7-DHT, respectivamente. Os dados são expressos como a média ± EPM, (n = 6 animais/grupo). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.

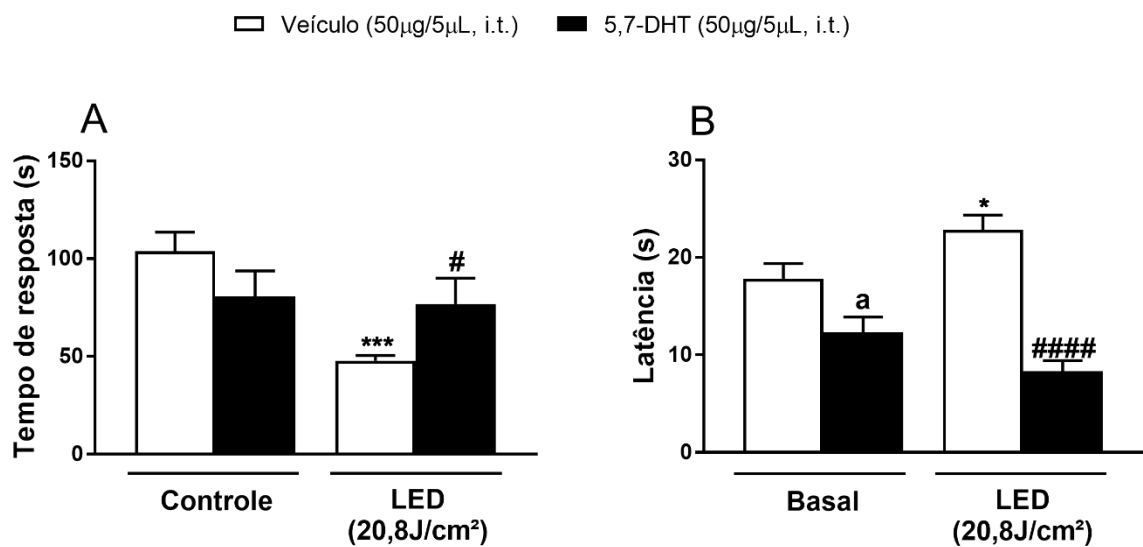


Figura 48 - Figuras representativas de células imunorreativas para triptofano hidroxilase (TPH) no núcleo magno da rafe antes e após administração intratecal de 5,7-DHT (50µg/i.t.).

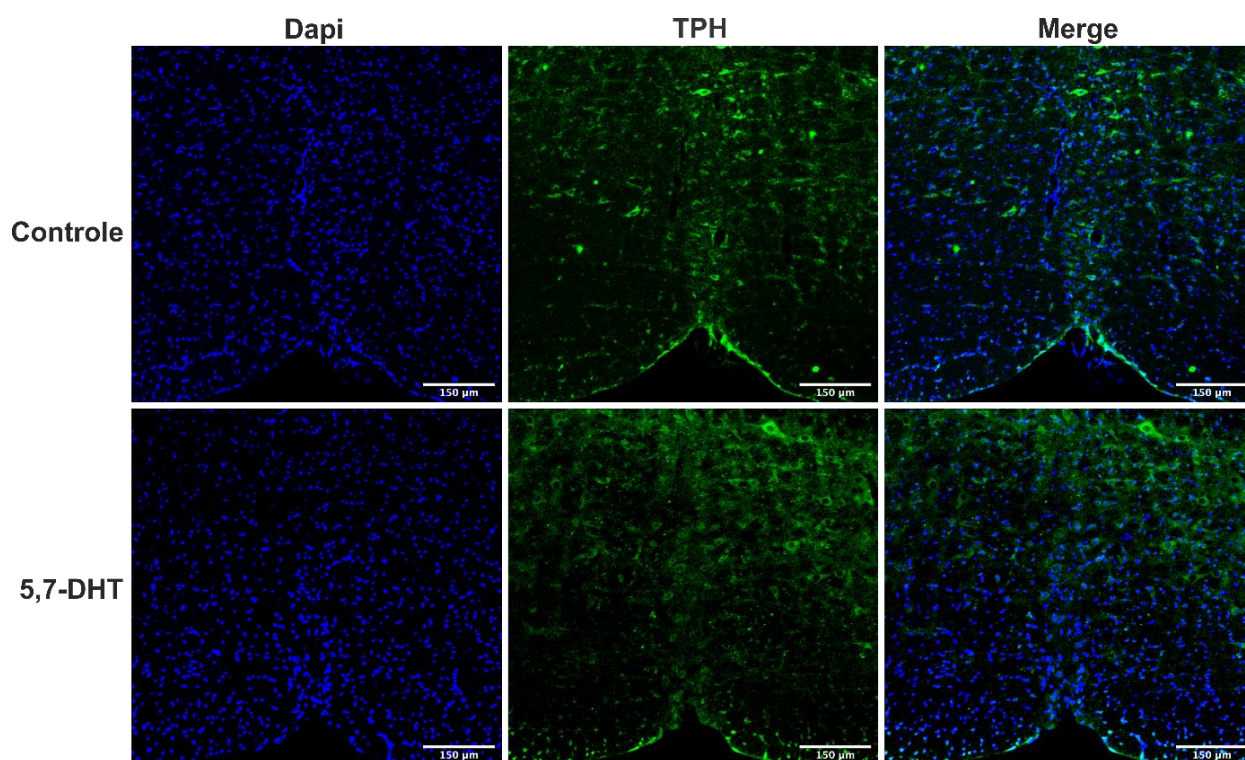


Figura 49 - Figuras representativas de células imunorreativas para triptofano hidroxilase (TPH) no núcleo magno da rafe antes e após administração intratecal de 5,7-DHT (50µg/i.t.). (A) Células imunorreativas para triptofano hidroxilase. (B) Lesão com 5,7-DHT promoveu uma menor atividade para TPH. As setas indicam células imunorreativas para TPH.

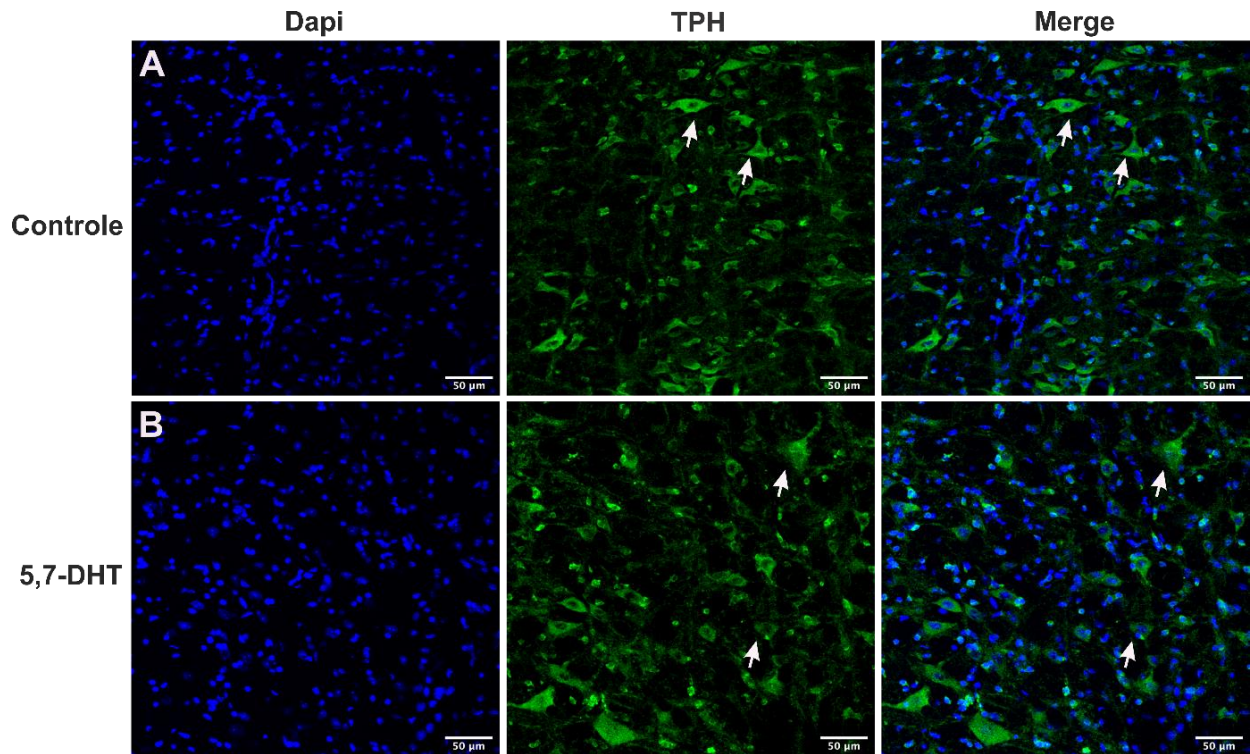


Figura 50 - Figuras representativas de fibras imunorreativas para 5-hidroxitriptamina (5-HT) no corno dorsal da medula espinal.

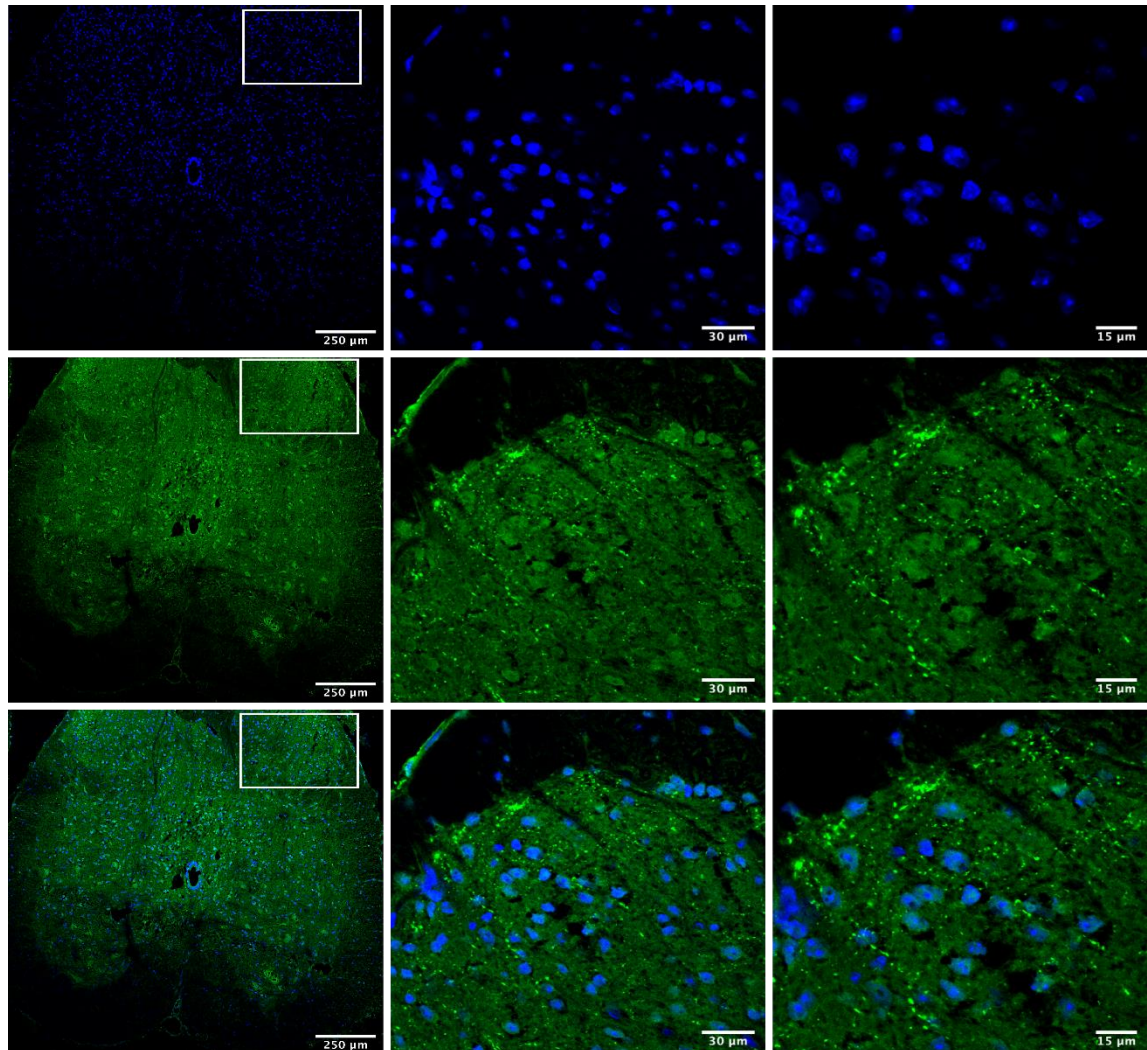


Figura 51 - Figuras representativas de fibras imunorreativas para 5-hidroxitriptamina (5-HT) no corno dorsal da medula espinal após administração intratecal de 5,7-DHT (50 μ g/i.t.).

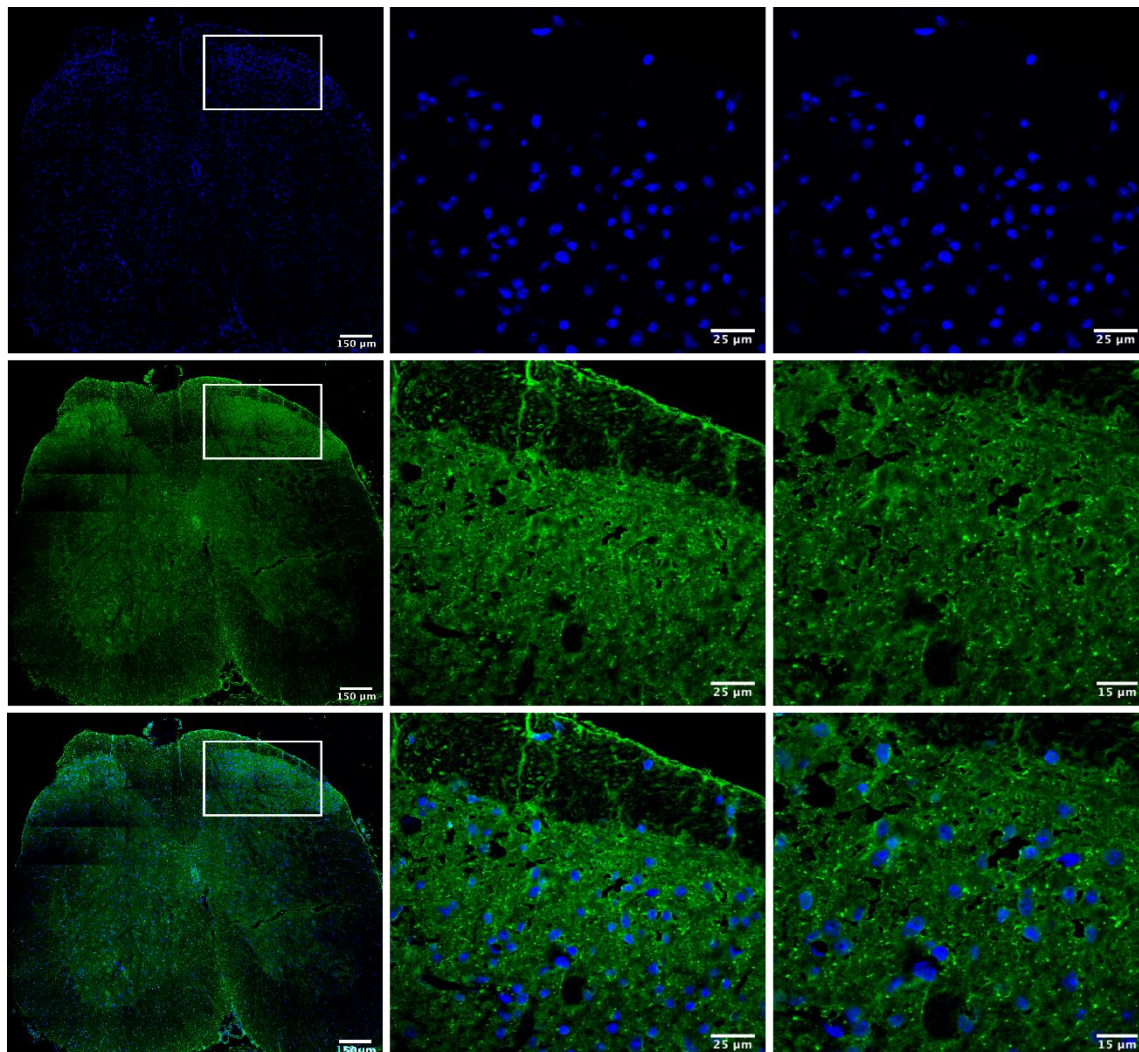


Figura 52 - Figuras representativas de fibras imunorreativas para (5-HT) no corno dorsal da medula espinal antes e após administração intratecal de 5,7-DHT (50µg/i.t.). As ponta de setas indicam fibras imunorreativas para 5-HT.

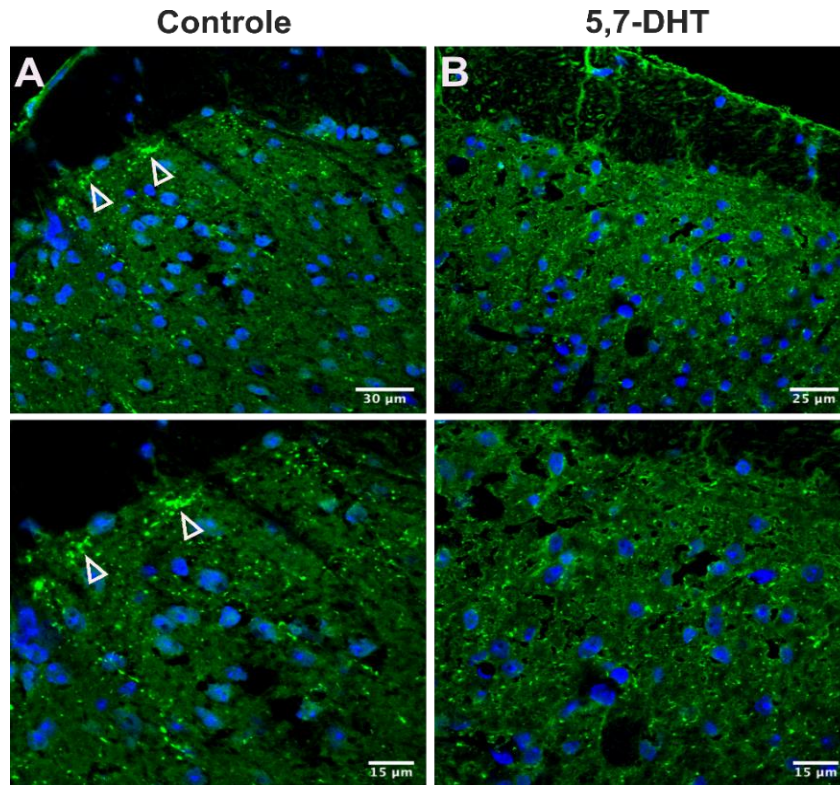


Figura 53 - Figuras representativas de neurônios imunorreativos para 5-hidroxitriptamina (5-HT) no núcleo magno da rafe antes e após administração intratecal de 5,7-DHT (50µg/i.t.).

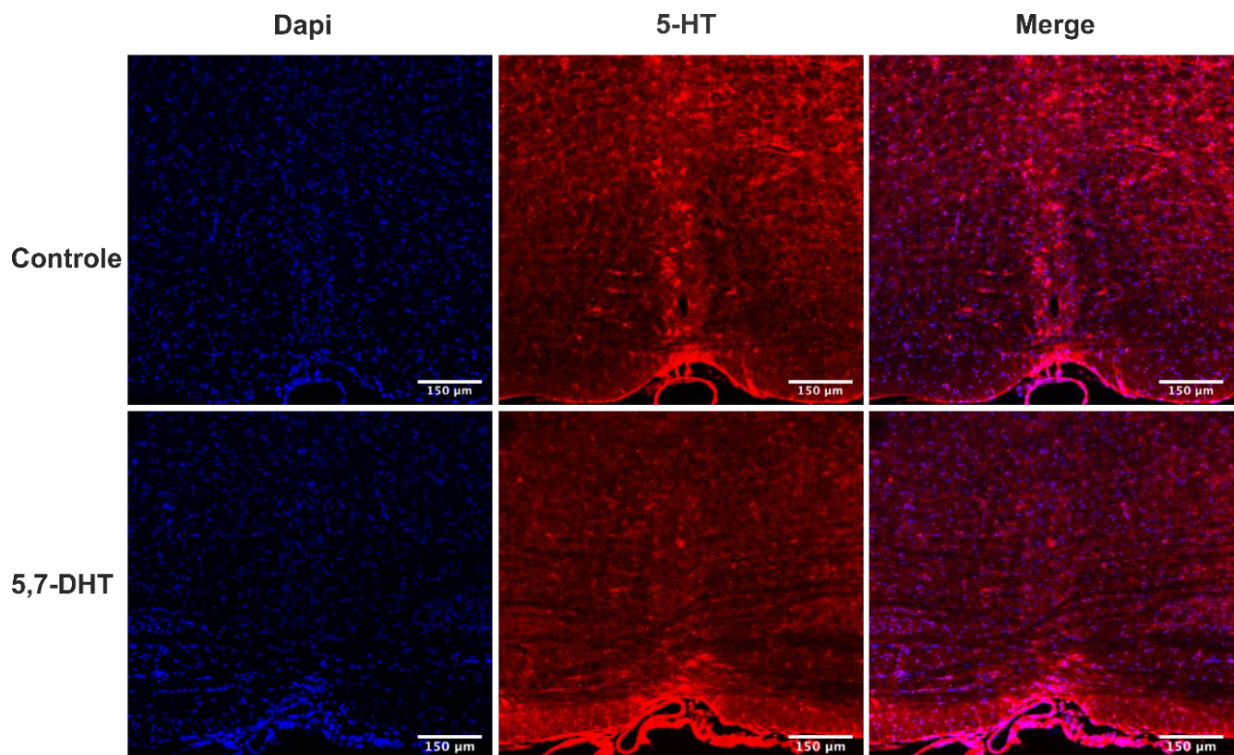
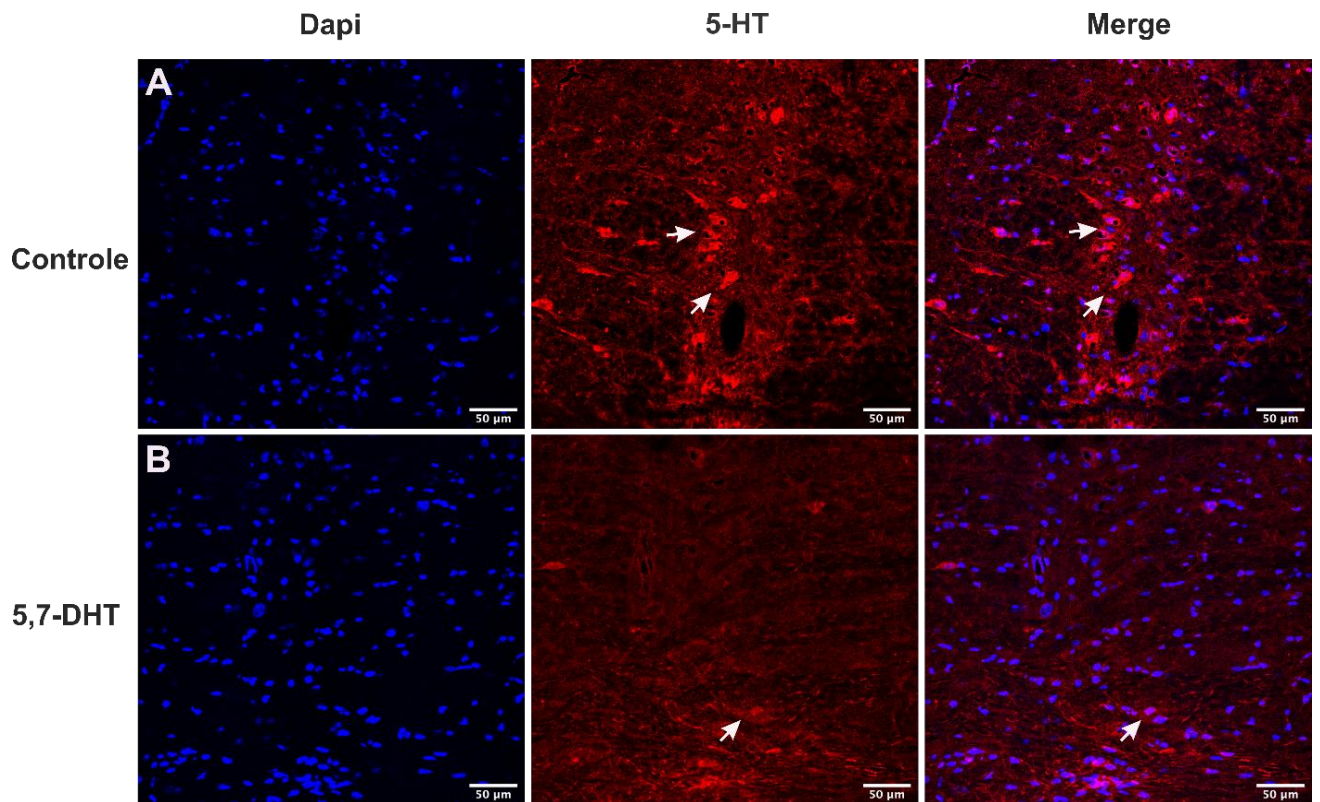


Figura 54 - Figuras representativas de neurônios imunorreativos para 5-hidroxitriptamina (5-HT) no núcleo magno da rafe antes e após administração intratecal de 5,7-DHT (50µg/i.t.). As setas representam neurônios imunorreativos para 5-HT.



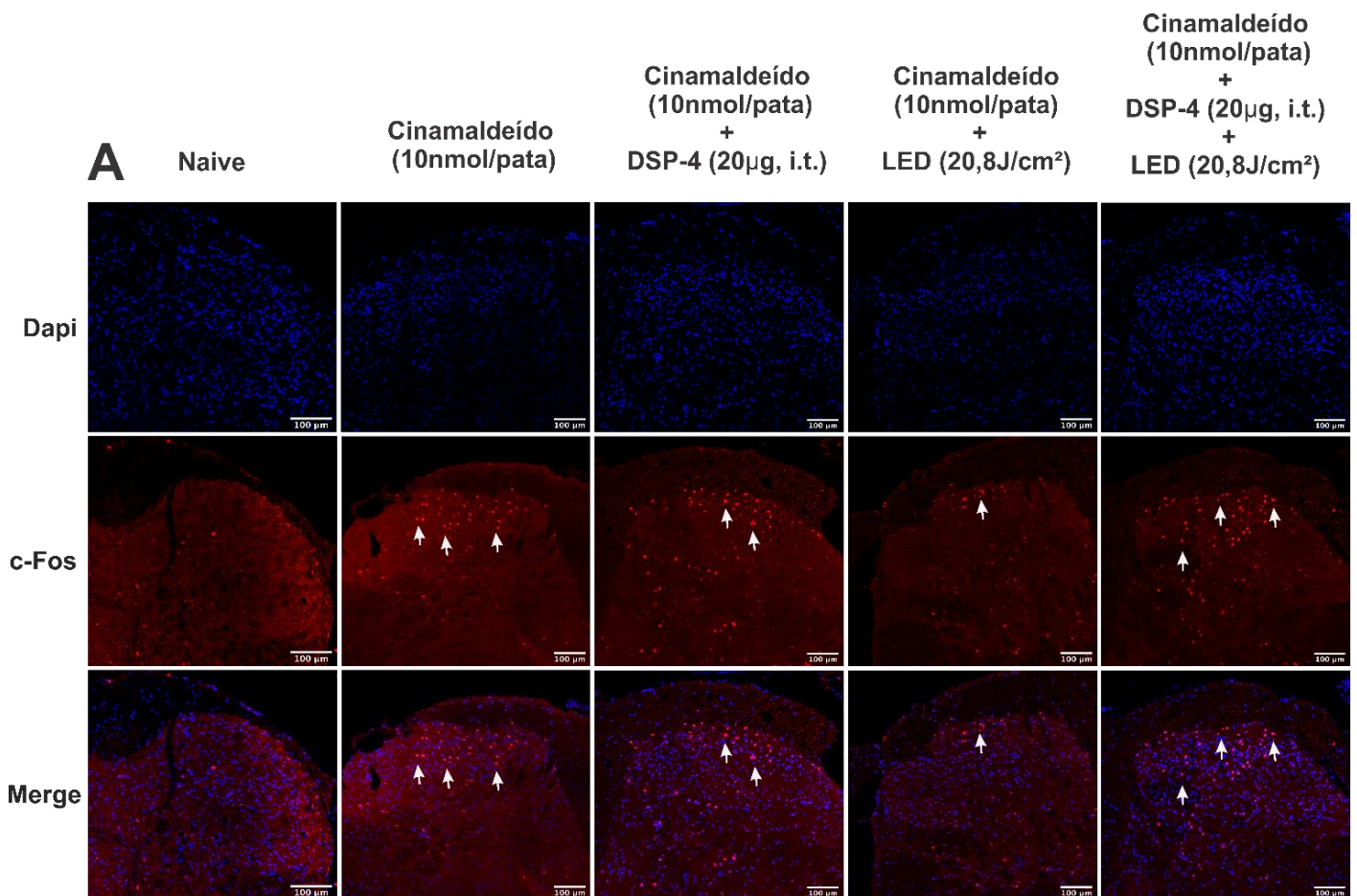
6.12 Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm²) na quantificação de c-Fos no corno dorsal da medula espinal dorsal de camundongos com administração por via intratecal de DSP-4 (20µg/i.t.) e 5,7-DHT (50µg/i.t.)

Em relação a imunofluorescência para c-Fos, o cinamaldeído promoveu um aumento na expressão da proteína c-Fos ($p < 0,0001$) e este aumento foi atenuado pelo tratamento com o LED no corno dorsal da medula espinal ($p < 0,0001$). Porém, quando administrado por via intratecal DSP-4 (20µg/i.t.) ou 5,7-DHT (50µg/i.t.), tal efeito foi prevenido, com um aumento na expressão da proteína c-Fos ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$). A administração por via intratecal de DSP-4 (20µg/i.t.) ou 5,7-DHT (50µg/i.t.) também promoveram um aumento na expressão da proteína c-Fos ($p < 0,05$ e $p < 0,05$), (Fig. 55 e 56, respectivamente).

Figura 55 - Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm²) na quantificação de c-Fos no corno dorsal da medula espinal de camundongos antes e após administração intratecal de DSP-4 (20µg/i.t.). (A)

Fotomicrografias representativas da imunofluorescência em diferentes grupos experimentais. (B)

Número de células imunorreativas para c-Fos no corno dorsal da medula espinal. ^ap<0,001 indica diferença significativa entre o grupo naive e o grupo cinamaldeído. ^bp<0,001 indica diferença significativa entre o grupo cinamaldeído e o grupo DSP-4. ****p<0,0001 indica diferença significativa entre o grupo cinamaldeído e o grupo cinamaldeído + LED. #####p<0,0001 o grupo cinamaldeído + LED e o grupo cinamaldeído + DSP-4 + LED Os dados são expressos como a média ± EPM, (n=6 animais/grupo). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.



□ Veículo (20 μ g/5 μ , i.t.) ■ DSP-4 (20 μ g/5 μ L, i.t.)

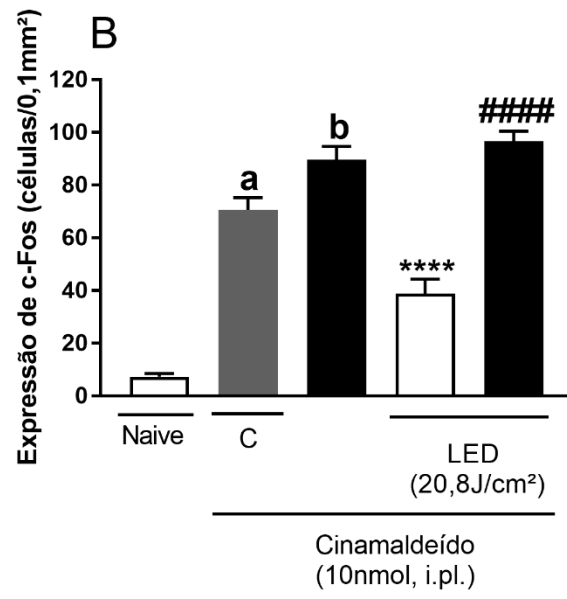
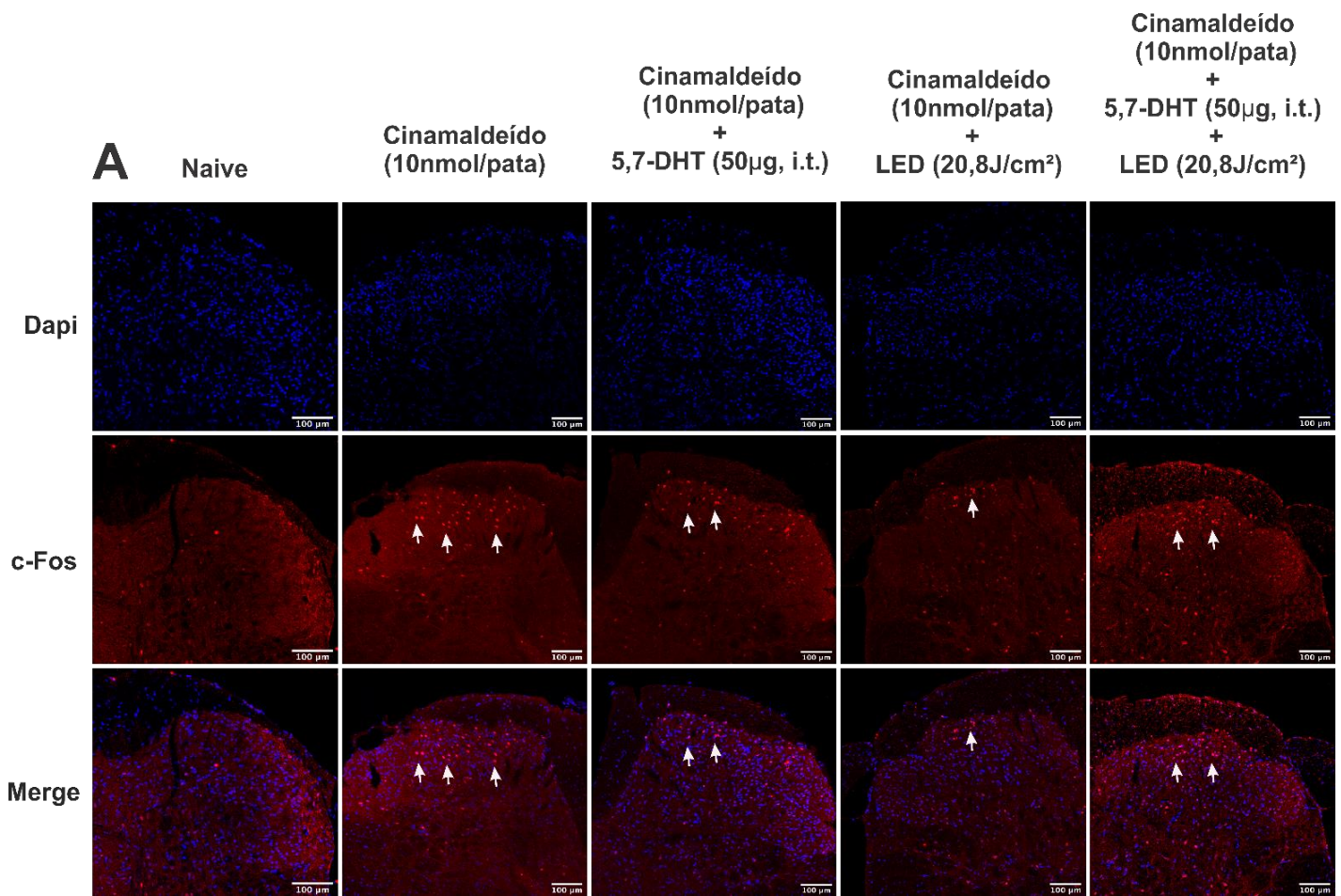
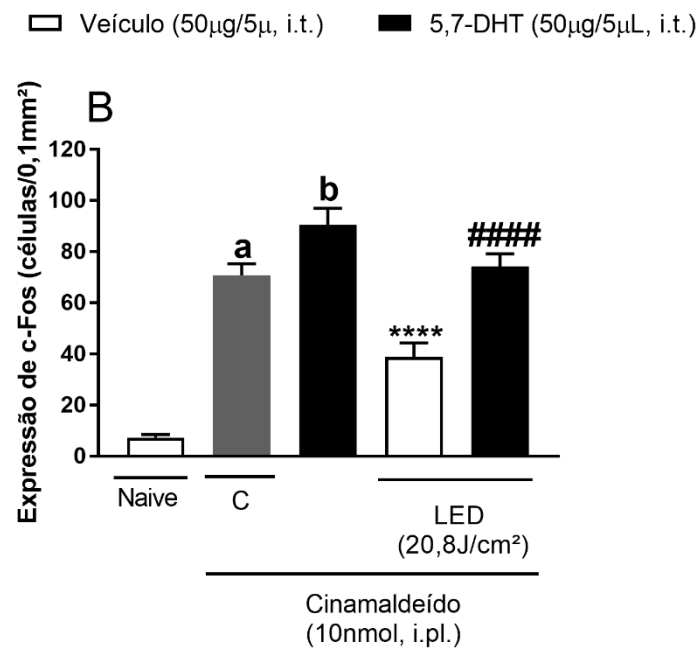


Figura 56 - Efeito do LED (890nm; 20,8J/cm²) na quantificação de c-Fos no corno dorsal da medula espinal de camundongos antes e após administração intratecal de 5,7-DHT (50µg/i.t.).

(A) Fotomicrografias representativas da imunofluorescência em diferentes grupos experimentais. (B) Número de células imunorreativas para c-Fos no corno dorsal da medula espinal. ^ap<0,001 indica diferença significativa entre o grupo naive e o grupo cinamaldeído. ^bp<0,001 indica diferença significativa entre o grupo cinamaldeído e o grupo 5,7-DHT. **** p<0,0001 indica diferença significativa entre o grupo cinamaldeído e o grupo cinamaldeído + LED. #####p<0,0001 o grupo cinamaldeído + LED e o grupo cinamaldeído + 5,7-DHT + LED Os dados são expressos como a média ± EPM, (n=6 animais/grupo). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.

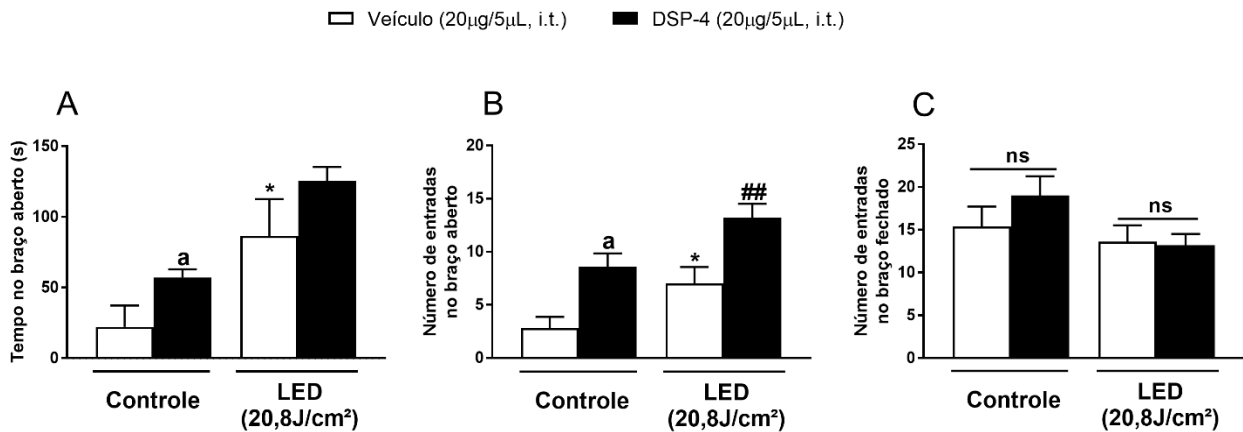




6.14 Efeito do LED (890; 20,8J/cm²) no comportamento semelhante à ansiedade expresso no teste do labirinto em cruz elevado com e sem administração por via intratecal de DSP-4 (20 μ g/i.t.)

Os resultados apresentados na Figura 57 demonstram que o tratamento com o LED, promoveu um maior número de entradas nos braços abertos ($p < 0,05$), assim como maior tempo de permanência nos braços abertos ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. A administração de DSP-4 (20 μ g/i.t.) promoveu um aumento no número de entradas nos braços abertos ($p < 0,01$) e o tempo de permanência ($p < 0,05$). Quando associado ao LED houve um aumento no número de entradas nos braços abertos ($p < 0,01$).

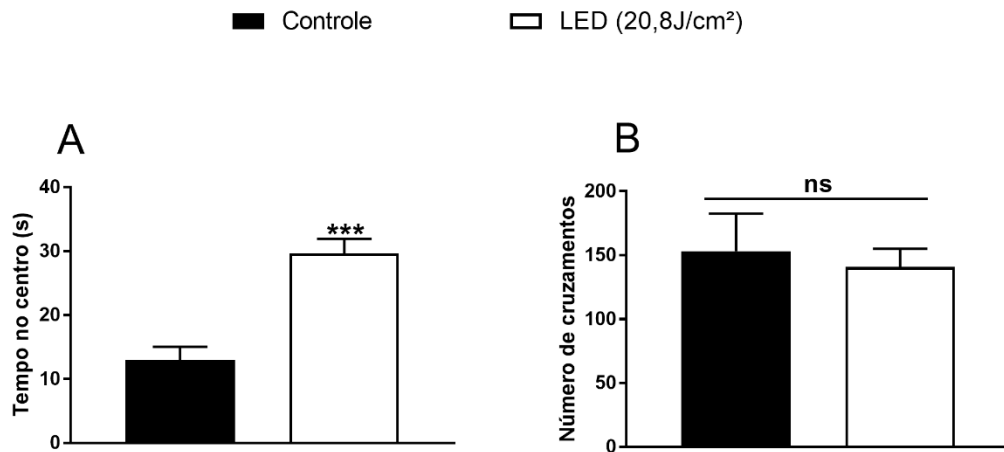
Figura 57 - Efeito do LED (890; 20,8J/cm²) no comportamento semelhante à ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado com e sem administração intratecal DSP-4 (20µg/i.t.). (A) * $p < 0,05$ indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo controle não tratado, respectivamente. ^a $p < 0,05$ indica diferença significativa entre o grupo controle e o grupo DSP-4, respectivamente. (B) * $p < 0,05$ indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo controle não tratado, respectivamente. ## $p < 0,01$ indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo LED + DSP-4, respectivamente. ^a $p < 0,01$ indica diferença significativa entre o grupo controle e o grupo DSP-4, respectivamente. (C) A exposição ao LED não alterou o número de vezes que os animais entraram nos braços fechados. Os dados são expressos como a média \pm EPM, (n=6 animais/grupo). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.



6.15 Efeito do LED (890; 20,8J/cm²) no comportamento da atividade locomotora

Os resultados apresentados na Figura 58 demonstram que o tratamento com o LED, promoveu um aumento no tempo de permanência dos animais no centro ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle. Em relação ao número de cruzamentos, não houve diferença significativa.

Figura 58 - Efeito do LED (890; 20,8J/cm²) no comportamento semelhante à ansiedade e da atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto. (A) *** $p < 0,001$ indica diferença significativa entre o grupo tratado com LED e o grupo controle não tratado, respectivamente. (B) A exposição ao LED não afetou a atividade locomotora. Os dados são expressos como a média \pm EPM, (n=6 animais/grupo). A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Tukey.



7 DISCUSSÃO

Embora estudos tenham mostrado os efeitos positivos da fototerapia sobre a dor aguda, os mecanismos envolvidos não estão bem elucidados. Previamente, foi demonstrado que o LED (890nm, 20,8J/cm²) de baixa intensidade apresentou-se com um potencial efeito antinociceptivo em diferentes tipos de modelos de nocicepção, (PIGATTO *et al.*, 2017). Da mesma forma, foi demonstrado o envolvimento de alguns sistemas descendentes inibitórios no controle da dor (PIGATTO, 2015) e seus efeitos positivos na dor neuropática (PIGATTO *et al.*, 2013). Neste trabalho, nós confirmamos e estendemos os resultados experimentais obtidos anteriormente, bem como fornecemos novos subsídios neurobiológicos que apontam para importantes mecanismos envolvidos no efeito terapêutico da fotobiomodulação no controle da dor.

A dimensão cognitiva e emocional da dor é de especial importância no que se refere à sua experiência e ao seu gerenciamento clínico. Muitas evidências têm sugerido que as estruturas corticais cumprem um papel mais ativo no processamento nociceptivo do que até então se achava. Em geral, para a dor que reflete a estimulação excessiva de nociceptores especializados, existe uma relação adaptativa entre a sinalização de estímulos nocivos e o dano tecidual real ou iminente, correspondendo à função de alerta crucial da dor. No entanto, a "entrada-saída" para a transmissão nociceptiva está longe de ser invariante e pode ser ponderada em favor ou contra a sua passagem por uma abundância de mecanismos, incluindo sistemas descendentes facilitatórios e inibitórios da dor (BASBAUM, 1999; MILLAN, 1999; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004).

A modulação (facilitação ou inibição) da dor existe na forma de um circuito modulatório, com aferências em múltiplas áreas, incluindo o hipotálamo, a amígdala, o córtex cingulado anterior rostral (rACC), e se dirige para a região da substância cinzenta periaquedutal (PAG), ativando eferências da PAG para o bulbo. Os neurônios que se localizam no núcleo magno da rafe e no núcleo reticular gigantocelular, que estão incluídos no bulbo ventromedial rostral (RVM), projetam-se para a medula espinal (corno dorsal, CD), direta ou indiretamente, aumentando ou diminuindo a atividade da primeira sinapse da via nociceptiva sensorial discriminativa, modificando a experiência da dor (MILLAN, 2002; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

O mecanismo descendente pode modular a nocicepção por interação com vários elementos neuronais no corno dorsal da medula espinal: (1) os próprios terminais das fibras aferentes primárias (PAFs), (2) neurônios de projeção (PNs), (3) interneurônios excitatórios (EXIN) ou inibitórios (ININ) e (4) terminais de outras vias descendentes. Os mecanismos que medeiam o controle descendente inibitório da dor atenuam a liberação de mediadores pró-nociceptivos (ações pré-sinápticas) e, direta ou indiretamente (via interneurônios inibitórios), suprimindo a excitação dos neurônios de projeção (ações pós-sinápticas) (WILLIS; WESTLUND, 1997; MILLAN, 1999, 2002).

O efeito da fotobiomodulação é influenciado pela densidade de energia (ou fluência), tipo de lesão e o espectro de absorção da molécula fotorreceptora, que são moléculas capazes de serem excitadas pelos fótons incidentes e o comprimento de onda. Ao ser irradiado sobre a pele, o feixe luminoso sofre dois processos: uma parcela é refletida e outra parte penetra no tecido em proporções que dependem do comprimento de onda, das características do tecido receptor e do ângulo de incidência (ENWEMEKA, 2009; JENKINS; CARROLL, 2011). Uma vez que o pelo do animal poderia ser uma barreira para a total penetração da luz, o primeiro experimento realizado foi a comparação do efeito antinociceptivo do LED em animais com ou sem tricotomia na região ventral no modelo de nocicepção induzido pelo cinamaldeído, pois a aplicação da radiação foi sobre essa região. Os nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os animais com e sem tricotomia.

Os principais moduladores no controle descendente da dor são o sistema opioidérgico, serotoninérgico, noradrenérgico, GABAérgico, dopaminérgico, adenosinérgico, além dos canabinóides endógenos (BESSON, 1999; MILLAN, 2002; BASBAUM *et al.*, 2009). Todavia, os efeitos do sistema modulatório descendente sobre o processo nociceptivo no corno dorsal da medula espinal são bastante complexos (BENARROCH, 2008), uma vez que, por exemplo, a noradrenalina, serotonina e dopamina podem exercer papéis duais na nocicepção, dependendo do tipo de receptor envolvido, do sítio (local) de ação no corno dorsal e/ou do “*cross talk*” (comunicação cruzada) entre a sinalização neuroquímica local e as vias descendentes, incluindo adenosina, opioides endógenos e óxido nítrico (NO) (MILLAN, 2002; PERTOVAARA, 2006).

Os dados do presente estudo, demonstraram que nem a metisergida (antagonista não seletivo de receptores serotoninérgicos) nem o MDL72222

(antagonista seletivo de receptores 5-HT₃) foram capazes de prevenir o efeito antinociceptivo do LED. No entanto, WAY-100635 (antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}) e cetanserina (antagonista seletivo de receptores 5-HT₂) foram capazes de prevenir o efeito antinociceptivo do LED. Esses resultados corroboram alguns descritos na literatura sobre o possível envolvimento do sistema serotoninérgico na ação antinociceptiva do LED, em que alterações no metabolismo de 5-HT foram documentadas em pacientes de dor crônica (WALKER, 1983; SERGIO *et al.*, 2015). Da mesma forma, um estudo em um modelo de dor aguda, antagonistas de 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} preveniram o efeito da FBM, enquanto que o antagonista de 5-HT_{3A}, não foi capaz de prevenir (ERTHAL *et al.*, 2013). Enquanto que em outros estudos, em modelos de dor inflamatória, a administração de metisergida por via intratecal, também não foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo do Laser (PEREIRA *et al.*, 2017).

Exposição aguda e crônica de estímulos nocivos foi demonstrada ativar neurônios serotoninérgicos no RVM e acelerar o “*turnover*” de 5-HT na medula espinal (YOSHIMURA; FURUE, 2006; AVILA-ROJAS *et al.*, 2015; OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2015). Mecanismos opioides supraespinais têm sido implicados na estimulação da transmissão serotoninérgica por estímulos nocivos (ZHANG *et al.*, 2000d; KIM *et al.*, 2016a). Estudos de estimulação elétrica do cérebro após administração direta de 5-HT na medula espinal convergem para a conclusão de que a via descendente serotoninérgica exerce uma bidirecional influência sobre processamento nociceptivo no CDME (ZHANG *et al.*, 2000b, 2000c), mediando vias de dor descendentes inibitórias (DI) e descendentes facilitatórias (DF) (MILLAN, 2003). Este reconhecimento de ações pró e antinociceptivas de 5-HT no CDME permite a reconciliação de uma infinidade de dados contraditórios e pode ser mais bem acomodado dentro de uma estrutura que engloba ações opostas de 5-HT em função de: (1) classes individuais de receptores 5-HT, que aumenta ou diminui a atividade neuronal e (2) a localização contrastante de tipos específicos de receptores de 5-HT no CDME, facilitando ou atenuando a passagem de informações nociceptivas para o cérebro (MILLAN, 2002; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004). Coletivamente, as observações acima sugerem que a 5-HT provoca um espectro de ações pró e antinociceptivas. Ações contrastantes de 5-HT em vários subtipos de receptores diferencialmente acopladas aos mecanismos de transdução intracelular oferecem uma explicação convincente sobre alguns efeitos duais.

Os resultados do presente estudo, demonstraram que a fentolamina (antagonista não seletivo de receptores adrenérgicos), o prazosin (antagonista seletivo de receptores α 1-adrenérgicos), a yohimbina (antagonista seletivo de receptores α 2-adrenérgicos) e o propranolol (antagonista não seletivo de receptores β -adrenérgicos), foram capazes de prevenir o efeito antinociceptivo do LED, mostrando um possível envolvimento do sistema noradrenérgico.

Há também evidências de interação entre vias noradrenérgicas e serotoninérgicas quanto à modulação do processamento nociceptivo (MILLAN, 1999; GENCER; GUNDUZ; ULUGOL, 2015). Notavelmente, há evidências para a indução sinérgica de antinocicepção por agonistas de adrenoreceptores- α 2 (α 2-AR) e 5-HT1A. Além disso, a influência de vários subtipos de receptor de 5-HT após a nocicepção sugere consideráveis margens para a exploração mais refinada e direcionada do papel conjuntivo de vias descendentes noradrenérgicas e serotoninérgicas na indução de antinocicepção (AVILA-ROJAS *et al.*, 2015; GENCER; GUNDUZ; ULUGOL, 2015).

As populações segmentares operam em sinergia com suas homólogas supraespinais e, em linha com o papel das vias noradrenérgicas descendentes na expressão da antinocicepção opioidérgica supraespinal, os receptores- α 2 da medula espinal contribuem para a interação "multiplicativa" entre as populações cerebrais e segmentárias do receptor opioide (OSSIPOV; PORRECA, 2005; BENARROCH, 2008; HEINRICHER *et al.*, 2009). Os opioides e receptores- α 2 compartilham mecanismos comuns de transdução intracelular, notadamente a supressão da atividade de adenilato ciclase e uma influência positiva e negativa sobre as correntes K^+ e Ca^{+2} , respectivamente (MILLAN, 2002; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004; OBATA, 2017).

De modo correspondente, vários estudos demonstraram propriedades antinociceptivas de agonistas opioides e de receptores- α 2, em geral, sinérgicas, atuando na dor aguda e crônica inflamatória e neuropática (OSSIPOV *et al.*, 1997; BENBOUZID *et al.*, 2008; BANNISTER; DICKENSON, 2017). Os receptores μ -opioides estão envolvidos nessas interações e, juntamente com agonistas de α 2-AR, podem potencializar as ações antinociceptivas de agonistas delta (δ) e kappa (κ), (PERTOVAARA, 2006; SCHAIBLE, 2007). De fato, com relação à distribuição sistêmica e espinal, eles aumentam a magnitude e a duração da analgesia induzida por opioides (HERRADON *et al.*, 2008).

Investigações neuroquímicas, eletrofisiológicas e comportamentais, utilizando modelos de estados dolorosos inflamatórios e neuropáticos, estudos de diversas modalidades de estímulo e análise dos efeitos da administração de medicamentos sistêmicos e espinhais, convergem para a conclusão de que os $\alpha 2$ -AR localizados em CDME desempenham um papel crucial na mediação de DI por projeções noradrenérgicas ao CDME (MILLAN, 2002; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004; PERTOVAARA, 2006). Além disso, tais ações são expressas tanto contra estímulos nociceptivos agudos, na maioria dos casos, de forma mais acentuada, em condições de inflamação periférica de longo prazo (BENARROCH, 2008; HERRADON *et al.*, 2008). Existem evidências clínicas consideráveis de que os agonistas de $\alpha 2$ -AR promovem analgesia numa diversidade de quadros dolorosos, incluindo a dor neuropática. Essas ações refletem o envolvimento de $\alpha 2$ -AR localizadas no CDME e suas expressões embasam a administração de drogas por meio da medula espinal (epidural ou intratecal) (MILLAN *et al.*, 1997; OBATA, 2017).

Apesar do crescente interesse no papel dos adrenoreceptores- $\alpha 1$ ($\alpha 1$ -ARs) periféricos na transdução de ações pró-nociceptivas de noradrenalina (NA) liberadas de fibras simpáticas para terminais primários (MILLAN, 1999; OBATA, 2017), as populações segmentares de $\alpha 1$ -ARs foram praticamente ignoradas em comparação com os $\alpha 2$ -AR. No entanto, um conjunto razoável de evidências sugerem que $\alpha 1$ -ARs modulam o processamento nociceptivo no CDME (GOTOH; ANDOH; KURAISHI, 2011; JEONG *et al.*, 2014).

A ativação de $\alpha 1$ -ARs pode embasar influência excitadora direta de NA sobre neurônios CDME (FLEETWOOD-WALKER, 1992; JONES, 1992, MILLAN, 1997 e 2002). Porém, uma subpopulação de neurônios excitados por NA/ $\alpha 1$ -ARs representa ININ. Isso explicaria relatos isolados de que $\alpha 1$ -AR medeia a antinocicepção em nível segmentar (MILLAN *et al.*, 1997; GOTOH; ANDOH; KURAISHI, 2011). Da mesma forma, há um interesse pequeno nos adrenoreceptores- β pois, vários estudos demonstram seu papel pró-nociceptivo. No entanto, estudos recentes têm evidenciado seu papel também na antinocicepção (JEONG *et al.*, 2014; GENCER; GUNDUZ; ULUGOL, 2015).

O possível envolvimento do sistema dopaminérgico também foi demonstrado no presente estudo, pois a administração por via intratecal de haloperidol (antagonista não seletivo de receptores dopaminérgicos) foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo do LED.

Em comparação com a vasta literatura dedicada à noradrenalina e serotonina, as ações espinais da dopamina (DA) receberam pouca atenção. Porém, a existência de uma pequena população de células sintetizadoras de DA no DRG foi confirmada (PRICE; MUDGE, 1983). No entanto, a inervação dopaminérgica da medula espinal é derivada em grande parte das estruturas cerebrais (BENARROCH, 2008; OBATA, 2017).

Pouco se sabe sobre a modulação fisiopatológica da transmissão dopaminérgica espinal, embora a entrada nociva aguda e sustentada acelere o aumento de dopamina (DA) no CDME, sugerindo um aprimoramento na atividade de caminhos dopaminérgicos descendentes (GAO *et al.*, 2001; BANNISTER; DICKENSON, 2017). Existem relatos clínicos de que os níveis de líquido cefalorraquidiano de DA são diminuídos em certos tipos de dor crônica (JAÈÀÈSKELAÈINEN, SATU K.RINNE *et al.*, 2001; WOOD *et al.*, 2007). Estudos sugerem que os agonistas (família de receptor D2) D2 potenciam a antinocicepção opioidérgica (ZARRINDAST; NASSIRI-RAD; PAZOUKI, 1999; FARAMARZI; ZENDEHDEL; HAGHPARAST, 2016; SIAHPOSHT-KHACHAKI *et al.*, 2017). Da mesma forma, foi observado ações antinociceptivas de agonistas dopaminérgicos após a sua introdução no RMg, presumivelmente devido à modulação de controles descendentes, embora o mecanismo preciso envolvido ainda precisa ser elucidado (PHILLIPS; GELGOR; MITCHELL, 1992; MORADI; YAZDANIAN; HAGHPARAST, 2015).

Estudos recentes têm demonstrado o envolvimento do sistema dopaminérgicos com ação antinociceptiva, tanto em modelos agudos como crônicos (JEONG *et al.*, 2014; YAZDI-RAVANDI *et al.*, 2014; DOURADO *et al.*, 2016; OBATA, 2017), bem como uma possível relação entre mecanismos dopaminérgicos, noradrenérgicos e serotoninérgicos para a modulação do processamento nociceptivo no CDME (JEONG *et al.*, 2014; OBATA, 2017).

A possível explicação para a indução de antinocicepção por meio de receptores D2 da medula espinal é uma ação inibidora direta em terminais PAF ou PNs nocirresponsivos. Isso também seria consistente com a influência inibitória dos receptores D2 sobre a excitabilidade neuronal mediada pela inibição da adenilato ciclase (AC) e supressão e ativação das correntes de Ca^{+2} e K^{+} , respectivamente (MILLAN, 2002; BANNISTER; DICKENSON, 2017). No entanto, a administração

espinal de agentes dopaminérgicos deve ser levada em consideração nas investigações clínicas experimentais.

Em um estudo anterior, mostramos que a naloxona (antagonista não seletivo de receptores opioides), injetada por via intraperitoneal, foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo do LED (PIGATTO, 2015). Em consonância com esse dado, os nossos resultados mostraram que a naloxona injetada por via intratecal e intracerebroventricular, preveniu o efeito antinociceptivo do LED. Também confirmamos o envolvimento de receptores μ -opioides, uma vez que, quando injetado CTOP (antagonista de receptores μ_1/μ_2 -opioides) por via intratecal, preveniu o efeito antinociceptivo do LED. Esses resultados corroboram dados já existentes na literatura, em que foi demonstrado que a naloxona injetada por via intratecal preveniu o efeito do laser de baixa intensidade e em outros estudos, o laser promoveu um aumento da concentração de β -endorfinas no modelo de dor neuropática (HAGIWARA *et al.*, 2007).

Os receptores opioides localizados em estruturas supraespinais e no CDME desempenham um papel crucial na mediação da antinocicepção e têm sido implicados no mecanismo de ação de muitas drogas analgésicas (BASBAUM; FIELDS, 1984; MILLAN, 2002; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004). Os neurônios da PAG expressam receptores opioides que, quando ativados por opioides endógenos, estimulam os neurônios serotoninérgicos no núcleo magno rafe (SANOJA; VANEGAS; TORTORICI, 2008; HEINRICHER *et al.*, 2009). Esses neurônios serotoninérgicos do RVM e neurônios noradrenérgicos do “locus coeruleus” e “subcoeruleus” projetam-se diretamente, através do funículo dorsolateral para o CDME (MILLAN, 2002; BENARROCH, 2008). Há vias que contêm β -endorfinas que se projetam do núcleo arqueado para a PAG, e também participam da indução da antinocicepção por meio, por exemplo, de estresse nocivo e não nocivo e moderam a nocicepção que acompanha a inflamação do tecido (MILLAN, 2002; OSSIPOV; PORRECA, 2005; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010). Esses papéis de β -endorfinas se assemelham as projeções noradrenérgicas descendentes que contribuem para mecanismos da via descendente inibitória desencadeados por ações de β -endorfinas na PAG (PERTOVAARA, 2006; SCHAIBLE, 2007; BENARROCH, 2008).

A ativação dos neurônios na via descendente inibitória da dor estimula a liberação de serotonina e noradrenalina de seus axônios no nível da medula espinal, que por sua vez induz a secreção de encefalinas por meio da ativação dos

interneurônios inibitórios das lâminas I, II e V (PERTOVAARA, 2006; SCHAIBLE, 2007; BENARROCH, 2008). Esses opioides endógenos inibem pré e pós-sinápticamente os neurônios aferentes primários que se projetam para o CDME via receptores opioides, resultando em analgesia (MILLAN, 2002; KIBALY; LOH; LAW, 2016).

No presente estudo, também foi confirmado o possível envolvimento do sistema GABAérgico, uma vez que, a administração intratecal da bicuculina (antagonista seletivo de receptores GABAA) e do faclofeno antagonista seletivo de receptores GABAB), preveniram o efeito antinociceptivo do LED.

Sabe-se que um subconjunto dos neurônios serotoninérgicos, projetando para a CDME revela uma co-localização com alguns neurotransmissores (sustância P (SP), ácido gama amino-butírico (GABA), dinorfina (DYN) e encefalina (ENK)), que provavelmente interagem com a serotonina (5-HT) na modulação do processamento nociceptivo após a sua liberação concomitante na CDME (OKAZAKI, 2008; MENDIGUREN; AOSTRI; PINEDA, 2017).

O neurotransmissor inibitório GABA exibe um papel chave na modulação do processamento nociceptivo. Tanto receptores GABAA e GABAB são encontrados no CDME, particularmente nas lâminas superficiais, na qual eles são localizados em terminais de pequeno e grande diâmetro. Além disso, eles ocorrem em neurônios intrínsecos do CDME, inibindo ambos (MILLAN, 1999; MALAN *et al.*, 2002). Através de ações nos receptores GABAA e GABAB, tornou-se evidente que a atividade GABAérgica endógena e constitutiva da medula espinal é responsável por uma inibição tônica que impede que estímulos mecânicos e térmicos inócuos sejam percebidos como aversivos ou dolorosos, em resposta ao estímulo nocivo aguda e crônica (MILLAN, 2002; SILVA; SILVA; PRADO, 2013; DIAS; PRADO, 2016).

Uma proporção de neurônios serotoninérgicos derivado do RMg que inervam lâminas superficiais do CDME, sintetiza e libera GABA (BENARROCH, 2008; OKAZAKI, 2008). Isto sugere que caminhos "serotoninérgicos" podem reduzir a transmissão nociceptiva (eliciar DI) não só pelas ações excitatórias de 5-HT no ININs GABAérgica no CDME, mas também pela inibição GABAérgica direta PNs (WILLIS, 1988; TAKAHASHI *et al.*, 2010). O GABA é também co-localizado com neurônios noradrenérgicas (MENDIGUREN; AOSTRI; PINEDA, 2017), proporcionando ainda mais fontes potenciais supraespinais de GABA para a expressão de DI no CDME.

Foi demonstrado no presente estudo, que o sistema colinérgico parece estar envolvido no efeito antinociceptivo do LED, uma vez que a administração via intratecal de atropina (antagonista não seletivo de receptores muscarínicos) e de hexametilenio (antagonista não seletivo de receptores nicotínicos), preveniram o efeito antinociceptivo do LED.

Mecanismos colinérgicos para a modulação da nocicepção são particularmente intrigantes, na medida em que a acetilcolina (ACh) pode estar envolvida na ativação de vias descendentes não colinérgicas que medeiam a DI; na mediação de DI seguindo sua própria liberação de vias descendentes e na indução de antinocicepção após liberação de ININs no CDME. Além disso, a ACh modula a nocicepção por um padrão complexo de efeitos mediados por meio de várias classes de receptores muscarínicos e nicotínicos (ZHANG *et al.*, 2000c; TAKASU *et al.*, 2006; OBATA, 2017).

A interação entre α 2-ARs e mecanismos colinérgicos no CDME é de pertinência para a evidência de indução sinérgica de antinocicepção pela administração espinal de agonistas α 2-AR e inibidores da colinesterase em ratos (GOTOH; ANDOH; KURAIISHI, 2011; SILVA; SILVA; PRADO, 2013). Há evidências implicando as vias descendentes serotoninérgicas na antinocicepção provocada por uma diversidade de mecanismos; destas, incluem populações supraespinais de receptores nicotínicos. (ZHANG; MCKENNA; BRIGGS, 2001; UMANA *et al.*, 2017).

Além disso, os terminais colinérgicos entram em contato com uma população substancial de neurônios intrínsecos do CDME, incluindo PNs. Um número considerável de ININs localizada no CDME exibem uma co-localização de ACh com GABA, que pode agir cooperativamente na indução de antinocicepção (OBATA, 2017; UMANA *et al.*, 2017; ZHANG; CRAGG, 2017). Da mesma forma que as ações espinais de agonistas de 2-AR, a ativação supraespinal de receptores μ -opioides pela morfina aumenta a liberação de ACh no CDME, enquanto a morfina é potencializada por agonistas colinérgicos e inibidores da colinesterase. Essa interação pode refletir, então, o papel do sistema colinérgico por meio de vias descendentes noradrenérgicas na mediação das ações cerebrais de agonista μ -opioide (OKAZAKI, 2008; ZHANG; CRAGG, 2017).

Sabe-se que, de forma recíproca, a ACh (por meio de uma ação em receptores nicotínicos localizados em terminais adrenérgicos) aumenta a liberação espinal de NA

que, através de $\alpha 2$ -ARs, contribui para mecanismos nicotínicos de antinocicepção no CDME (MENDIGUREN; AOSTRI; PINEDA, 2017; ZHANG; CRAGG, 2017). É importante ressaltar que mecanismos muscarínicos supraespinais também modulam a nocicepção. Assim, neurônios colinérgicos no RVM (receptores M2), no hipotálamo e na PAG podem desencadear ativação de vias descendentes noradrenérgicas e, posteriormente, receptores $\alpha 2$ -ARs no CDME (MILLAN, 2002; OBATA, 2017). Além disso, ativação de decrescente de neurônios colinérgicos originários do RVM pode eliciar DI (JIANG *et al.*, 2018).

Para investigar se o LED seria capaz de reduzir a expressão de c-Fos, foi realizada uma análise de imunistoquímica e de imunofluorescência de secções da medula espinal lombar. Os resultados demonstraram que o cinamaldeído aumentou a expressão de c-Fos no corno dorsal da medula espinal e que o tratamento com o LED reduziu a expressão da proteína c-Fos produzida pelo cinamaldeído. Assim, para confirmar o envolvimento de estruturas supraespinais no efeito antinociceptivo do LED, foi realizada imunistoquímica e imunofluorescência das principais estruturas (PAG, “locus coeruleus” e RMg), os quais desempenham um papel importante na modulação descendente da dor. Nossos resultados demonstraram um aumento na expressão de c-Fos nas regiões vPAG, dPAG, “locus coeruleus” e no RMg e nos animais tratados somente com o LED e nos animais que sofreram o estímulo nocivo e foram tratados com o LED.

Estímulos nociceptivos modulam diversos caminhos e influenciam os níveis transcricionais e translacionais de muitos sistemas biológicos, incluindo genes imediatos, tais como c-Fos, um importante marcador para identificação de ativação neuronal (TODD, 2012; SANTOS *et al.*, 2018).

Para confirmar se o efeito analgésico do LED é mediado por vias descendentes inibitórias da dor, foram realizadas lesões por meio de neurotoxinas específicas dos principais sistemas das vias descendentes inibitórias da dor, noradrenérgica e serotoninérgica. Primeiramente, lesamos o caminho das fibras noradrenérgicas descendentes com as toxinas 6-OHDA e DSP-4, administrados por via intratecal. Este procedimento resultou na perda de fibras positivas para tirosina hidroxilase (TH) e dopamina β -hidroxilase (D β H) no corno dorsal da medula espinal e uma redução na imunorreatividade para TH e D β H no “locus coeruleus”. Os resultados mostraram que a lesão com ambas neurotoxinas da via noradrenérgica preveniram o efeito analgésico

do LED, tanto na placa quente como no modelo de nocicepção com cinamaldeído. Em seguida, lesaram-se fibras serotoninérgicas descendentes com a toxina 5,7-DHT, administrada por via intratecal. Este procedimento resultou na perda de fibras positivas para 5-HT no corno dorsal da medula espinal e reduziu a imunorreatividade do TPH e 5-HT no núcleo magno da rafe. Os resultados mostraram que a lesão com a neurotoxina da via serotoninérgica preveniu o efeito analgésico do LED, tanto na placa quente como no modelo de nocicepção com cinamaldeído. Foi demonstrado em estudos anteriores que a fotobiomodulação promoveu varicosidades axonais em cultura de células em neurônios no gânglio da raiz dorsal do nervo espinal, e promoveu uma diminuição progressiva no potencial de membrana mitocondrial e entre as varicosidades axônicas e nos corpos celulares neuronais, da mesma forma promoveu o bloqueio do fluxo axônico (CHOW; DAVID; ARMATI, 2007). Outro estudo, demonstrou uma diminuição de receptores de glutamato metabotrópico tipo 1, e na fosfatase ácida prostática e um aumento nas varicosidades positivas para tubulina no DRG (SOUSA *et al.*, 2018).

Uma vez confirmado o envolvimento das vias descendentes inibitórias da dor e demonstrado que o LED reduziu a expressão de c-Fos no CDME, foi realizada uma análise de imunofluorescência de secções da medula espinal lombar e assim, verificar qual seria o efeito do LED na expressão da proteína c-Fos após a administração via intratecal de DSP-4 e 5,7-DHT. Os resultados demonstraram novamente que o cinamaldeído aumentou a expressão de c-Fos no corno dorsal da medula espinal e que o tratamento com o LED reduziu a expressão da proteína c-Fos produzida pelo cinamaldeído. Porém, com a administração tanto do DSP-4 + LED, como da 5,7-DHT + LED, promoveram um aumento da expressão de c-Fos no CDME.

Dados já existentes na literatura têm demonstrado em modelos de dor inflamatória e neuropática substâncias endógenas (WALKER, 1983; LAAKSO; CABOT, 2005; HAGIWARA *et al.*, 2007; HSIEH; HONG; CHOU, 2015; SERGIO *et al.*, 2015; NEVES *et al.*, 2017) que codificam a ação analgésica pela fotobiomodulação. Dessa forma, os resultados apresentados neste estudo estendem dados da literatura e demonstram claramente, pela primeira vez, que o efeito analgésico do LED é mediado pelo controle inibitório descendente de estruturas supraespinais.

Uma vez confirmado o envolvimento da via noradrenérgica no efeito antinociceptivo do LED, para abordar a possibilidade de a antinocicepção ser o resultado de ansiedade, realizamos o teste do labirinto em cruz elevado (EPM), com e sem a depleção da via noradrenérgica com DSP-4. Nossos resultados demonstraram que os animais irradiados com o LED aumentaram o número de entradas nos braços abertos e passaram uma quantidade maior de tempo nos braços abertos sugerindo que a exposição ao LED é ansiolítica. Porém, o tempo e o número de entradas nos braços fechados não foram alterados significativamente, demonstrando que a função motora não foi afetada pelo tratamento com LED. Este resultado corrobora outros estudos realizados com luz infravermelha (810nm) em um modelo de estresse, no qual verificou-se uma redução no comportamento de ansiedade dos animais (ESHAGHI *et al.*, 2019; MEYNAGHIZADEH-ZARGAR *et al.*, 2019). Da mesma forma, Ibrahim *et al.* sugeriram um efeito ansiolítico da luz verde no teste do labirinto em cruz elevado; porém, nesse mesmo estudo, foram administrados antagonistas noradrenérgicos antes do tratamento com o LED verde e os animais foram avaliados no modelo da placa quente. Os resultados mostraram que os antagonistas noradrenérgicos não foram capazes de prevenir o efeito do LED verde (IBRAHIM *et al.*, 2018). Vale ressaltar que todas as interações farmacológicas e neurotóxicas noradrenérgicas deste estudo preveniram o efeito antinociceptivo do LED, confirmando, desta forma, que o efeito do LED não é mediado pelo estresse e que a via noradrenérgica está envolvida. Uma hipótese em relação a essa diferença de resposta é que ela pode estar relacionada ao comprimento de onda e irradiância, uma vez que na fotobiomodulação, comprimentos de onda maiores apresentam maior profundidade de penetração do seu feixe nos tecidos, enquanto a irradiância é basicamente a energia emitida pelo feixe de luz por unidade de área (ENWEMEKA, 2009; HUANG *et al.*, 2011).

Porém, quando administrado o DSP-4, houve um aumento no tempo de permanência nos braços abertos e no número de entradas. E quando administrado o DSP-4 somado ao tratamento com o LED, houve um aumento no tempo de permanência nos braços abertos. Estudos têm demonstrado que neurotransmissores, como a noradrenalina (NE), são capazes de regular a expressão de citocinas pró-inflamatórias e, portanto, podem contribuir para o surgimento de distúrbios relacionados ao estresse (LLORCA-TORRALBA *et al.*, 2019). Um alvo neural do LC é

a amígdala basolateral (BLA, do inglês, “basolateral amygdala”), que integra informações sensoriais para codificar e direcionar comportamentos afetivos diversos e, às vezes opostos, incluindo comportamentos de ansiedade, aversão e recompensa (MCCALL *et al.*, 2017). Porém, o tratamento com DSP-4 suprimiu citocinas inflamatórias circulantes induzidas por estresse e o comportamento semelhante à ansiedade (FINNELL *et al.*, 2019; LLORCA-TORRALBA *et al.*, 2019).

Os efeitos biológicos da terapia infravermelha são específicos do comprimento de onda e não são causados por efeitos térmicos (MOCHIZUKI-ODA *et al.*, 2002). A energia na região infravermelha do espectro eletromagnético não é ionizante e, portanto, não apresenta nenhum dos riscos associados à luz. Foi demonstrado que a irradiação com comprimentos de onda infravermelhos específicos, como o comprimento de onda de 800 a 1064nm, é capaz de penetrar no crânio e em seguida no cérebro (ZHANG *et al.*, 2000a; ILIC *et al.*, 2006; HENNESSY; HAMBLIN, 2018; VAS *et al.*, 2019). Estudos relatam seus potenciais benefícios em doenças da retina, acidente vascular encefálico, neurodegeneração e distúrbios cognitivos (PURUSHOTHUMAN *et al.*, 2014; OUESLATI *et al.*, 2015; REINHART *et al.*, 2015, 2017; LIEBERT *et al.*, 2016).

Da mesma forma, foi abordado a hipótese de que após a exposição ao LED, os animais apresentassem uma atividade locomotora reduzida, isso poderia contribuir para a antinocicepção. Para testar essa hipótese, investigamos se a exposição ao LED afetou o desempenho motor usando o teste do campo aberto. Os resultados demonstraram que não houve diferença no número de cruzamentos entre os animais tratados com o LED e sem tratamento, ou seja, não houve um comprometimento locomotor e, também permaneceram mais tempo na região central, sugerindo o efeito ansiolítico. Esse resultado corrobora com o estudo de Ibrahim *et al.*, no qual demonstraram um efeito ansiolítico do LED verde e no teste do rotarod os animais não apresentaram um comprometimento motor (IBRAHIM *et al.*, 2018).

8 CONCLUSÕES

- Os resultados deste estudo mostram que o LED (890nm, 20,8J/cm²) apresentou os seguintes efeitos:

- Não houve diferença significativa na realização da tricotomia, o que demonstra que a presença de pelos não interfere no poder de penetração do LED;

- O efeito antinociceptivo do LED pode ser mediado pelos principais sistemas endógenos de controle descendente da dor (noradrenérgico e serotoninérgico), podendo interagir com outros sistemas endógenos, sistema opioidérgico, GABAérgico, colinérgico e dopaminérgico;

- Reduziu a expressão da proteína c-Fos no corno dorsal da medula espinal;

- Aumentou a expressão da proteína c-Fos nas estruturas supraespinais (PAG, “locus coeruleus” e RMg);

- Apresentou uma redução no comportamento de ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado e no campo aberto;

- Não apresentou um comprometimento locomotor, confirmado no teste do labirinto em cruz elevado e no campo aberto.

Em conjunto, os dados obtidos no presente estudo fornecem evidências científicas para o emprego do LED infravermelho no tratamento da dor por meio de alguns dos seus mecanismos neurofisiológicos que contribuem para o seu potencial terapêutico e para continuidade de estudos pré-clínicos aprofundados.

9 REFERÊNCIAS

- AL-HASANI, R.; BRUCHAS, M. R. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-dependent Signaling and Behavior. **Anesthesiology**, v. 115, n. 6, p. 1363–1381, 2018.
- ANDERSEN, H. H.; GAZERANI, P.; ARENDT-NIELSEN, L. High-Concentration L-Menthol Exhibits Counter-Irritancy to Neurogenic Inflammation, Thermal and Mechanical Hyperalgesia Caused by Trans-cinnamaldehyde. **The Journal of Pain**, v. 17, n. 8, p. 919–929, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2016.05.004>>.
- ANDOH, T.; GOTOH, Y.; KURASHI, Y. Milnacipran Inhibits Itch-Related Responses in Mice Through the Enhancement of Noradrenergic Transmission in the Spinal Cord. v. 202, p. 199–202, 2013.
- AVCI, P.; NYAME, T. T.; GUPTA, G. K.; SADASIVAM, M.; HAMBLIN, M. R. Low-Level Laser Therapy for Fat Layer Reduction: A Comprehensive Review. **Lasers Surg Med.**, v. 45, n. 6, p. 349–357, 2013.
- AVILA-ROJAS, S. H.; VELA, I.; SALINAS-ABARCA, A. B.; BARRAGA, P.; PINEDA-FARIAS, J. B.; GRANADOS-SOTO, V. in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. **Brain Research**, v. 1622, p. 377–385, 2015.
- BALIKI, M. N.; APKARIAN, A. V. Nociception, pain, negative moods and behavior selection. **Neurom.**, v. 87, n. 3, p. 474–491, 2016.
- BANNISTER, K.; DICKENSON, A. H. What do monoamines do in pain modulation? **Curr Opin Support Palliat Care.**, v. 10, n. 2, p. 143–148, 2017.
- BAROLET, D. Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. **Semin Cutan Med Surg**, v. 27, n. 4, p. 227–238, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sder.2008.08.003>>.
- BASBAUM, A. I. Spinal Mechanisms of Acute and Persistent Pain. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 24, n. 1, p. 59–67, 1999.
- BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell.**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009.
- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: Brainstem Spinal Pathways and Endorphin Circuitry. **Ann. Rev. Neurosci**, v. 7, p. 309–338, 1984.
- BELL, A. The neurobiology of acute pain. **The Veterinary Journal**, v. 237, p. 55–62, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.05.004>>.
- BENARROCH, E. E. Descending monoaminergic pain modulation Bidirectional control and clinical relevance. **Neurology**, v. 71, n. 3, p. 217–221, 2008.
- BENBOUZID, M.; CHOUCAIR-JAAFAR, N.; YALCIN, I.; WALTISPERGER, E.; JOSE, M. Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice. **European Journal of Pain**, v. 12, n. 8, p. 1008–17, 2008.
- BESSION, J. M. The neurobiology of pain. v. 353, p. 1610–1615, 1999.

BJORDAL, J. M.; COUPPÉ, C.; CHOW, R. T.; TUNÉR, J.; LJUNGGREN, E. A. A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. **Australian Journal of Physiotherapy**, v. 49, n. 2, p. 107–16, 2003.

BLACKSHAW, L. A.; BRIERLEY, S. M.; HUGHES, P. A. TRP channels: new targets for visceral pain. **Gut**, v. 59, n. 1, p. 126–135, 2010.

BRODIN, E.; ERNBERG, M. and; OLGART, L. Neurobiology : General considerations – from acute to chronic pain. **Nor Tannlegefören Tid.**, v. 126, n. 1, p. 28–33, 2016.

CAO, H.; ZHANG, Y. Neuroscience and Biobehavioral Reviews Spinal glial activation contributes to pathological pain states. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 32, p. 972–983, 2008.

CARROLL, J. D.; MILWARD, M. R.; COOPER, P. R.; HADIS, M.; PALIN, W. M. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. **Dental Materials**, v. 30, n. 5, p. 465–475, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2014.02.006>>.

CHAKRABORTY, S.; NEPIYUSHCHIKH, Z.; DAVIS, M. J.; ZAWIEJA, D. C.; MUTHUCHAMY, M. Substance P activates both contractile and inflammatory pathways in lymphatics through the neurokinin receptors NK1R and NK3R Mariappan. **Microcirculation**, v. 18, n. 1, p. 24–35, 2012.

CHEN, A. C.; ARANY, P. R.; HUANG, Y.; TOMKINSON, E. M.; SULBHA, K.; KHARKWAL, G. B.; SALEEM, T.; MOONEY, D.; YULL, F. E.; BLACKWELL, T. S.; HAMBLIN, M. R. Low-Level Laser Therapy Activates NF-κB via Generation of Reactive Oxygen Species in Mouse Embryonic Fibroblasts. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e22453, 2011.

CHEN, C.; FICHNA, J.; LAUDON, M.; STORR, M. Antinociceptive effects of novel melatonin receptor agonists in mouse models of abdominal pain. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 5, p. 1298–1304, 2014.

CHOI, S.; HAN, K.; LEE, H.; HAN, E.; SUH, H. Possible antinociceptive mechanisms of opioid receptor antagonists in the mouse formalin test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 75, n. 2, p. 447–457, 2003.

CHOW, R. T.; ARMATI, P. J. Photobiomodulation: Implications for Anesthesia and Pain Relief 1. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 34, n. 10, p. 1–11, 2016.

CHOW, R. T.; DAVID, M. A.; ARMATI, P. J. 830 nm laser irradiation induces varicosity formation, reduces mitochondrial membrane potential and blocks fast axonal flow in small and medium diameter rat dorsal root ganglion neurons: Implications for the analgesic effects of 830 nm laser. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 12, n. 1, p. 28–39, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8027.2007.00114.x>>.

CHUNG, H.; DAI, T.; SHARMA, S.; HUANG, Y.-Y.; CARROLL, J.; HAMBLIN, M. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. **Ann. Biomed Eng.**, v. 40, n. 2, p. 516–533, 2012.

COSTA-PEREIRA, J. T.; SERRÃO, P.; MARTINS, I.; TAVARES, I. Serotonergic pain

modulation from the rostral ventromedial medulla (RVM) in chemotherapy-induced neuropathy: the role of spinal 5-HT₃ receptors. **Eur J Neurosci**, v. 5, 2019.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. **Annu Rev Neurosci**, v. 32, p. 1–32, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135531>>.

DAVIS, K. D.; FLOR, H.; GREELY, H. T.; IANNETTI, G. D.; MACKAY, S.; PLONER, M.; PUSTILNIK, A.; TRACEY, I.; TREEDE, R.; WAGER, T. D. Brain imaging tests for chronic pain: medical, legal and ethical issues and recommendations. **Nature Publishing Group**, v. 13, n. 10, p. 624–638, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2017.122>>.

DE FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, 2016.

DE SOUSA, M. V. P.; FERRARESI, C.; KAWAKUBO M; KAIPPERT B; EM, Y.; HAMBLIN MR. Transcranial low-level laser therapy (810 nm) temporarily inhibits peripheral nociception: photoneuromodulation of glutamate receptors, prostatic acid phosphatase, and adenosine triphosphate. **Neurophotonics**, v. 3, n. 1, p. 019801, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1117/1.NPh.3.1.015003>>.

DIAS, Q. M.; PRADO, W. A. The lesion of dorsolateral funiculus changes the antiallodynic effect of the intrathecal muscimol and baclofen in distinct phases of neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 124, p. 103–115, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.04.001>>.

DOURADO, M.; CARDOSO-CRUZ, H.; MONTEIRO, C.; GALHARDO, V. Effect of Motor Impairment on Analgesic Efficacy of Dopamine D_{2/3} Receptors in a Rat Model of Neuropathy. **Journal of Experimental Neuroscience**, v. 10, p. 51–57, 2016.

DUNNE, F. J.; GETACHEW, H.; CULLENBROOKE, F.; DUNNE, C. Pain and pain syndromes. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 79, n. 8, p. 449–453, 2018.

ENWEMEKA, C. S. Intricacies of dose in laser phototherapy for tissue repair and pain relief. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n. 3, p. 387–393, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1089/pho.2009.2503>>.

ERTHAL, V.; DA SILVA, M. D.; CIDRAL-FILHO, F. J.; SANTOS, A. R. S.; NOHAMA, P. ST36 laser acupuncture reduces pain-related behavior in rats: Involvement of the opioidergic and serotonergic systems. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 5, p. 1345–1351, 2013.

ESHAGHI, E.; SADIGH-ETEGHAD, S.; MOHADDES, G.; RASTA, S. H. Transcranial Photobiomodulation Prevents Anxiety and Depression via Changing Serotonin and Nitric Oxide Levels in Brain of Depression Model Mice : A Study of Three Different Doses of 810 nm Laser. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 51, n. 7, p. 634–642, 2019.

EYSENCK, H. J. **Experiments in personality: Volume 1: Psychogenetics and psychopharmacology**. 1st Edition ed. London: Routledge, 2014.

FAN, Y.; CHEN, P.; LI, Y.; ZHU, M. Effects of Chronic Social Defeat on Expression of Dopamine β -Hydroxylase in Rat Brains. **Synapse**, v. 67, n. 6, p. 300–312, 2013.

FARAMARZI, G.; ZENDEHDEL, M.; HAGHPARAST, A. D1- and D2-like dopamine receptors within the nucleus accumbens contribute to stress-induced analgesia in formalin-related pain behaviours in rats. **Eur J Pain**, v. 20, n. 9, p. 1423–32, 2016.

FINNELL, J. E.; MOFFITT, C. M.; HESSER, L. A.; HARRINGTON, E.; MELSON, M. N.; WOOD, C. S.; WOOD, S. K. The contribution of the locus coeruleus-norepinephrine system in the emergence of defeat-induced inflammatory priming. **Brain Behavior and Immunity**, v. 79, p. 102–113, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.01.021>>.

GÁL, P.; STAUSHOLM, M. B.; KOVÁČ, I.; DOSEDLA, E.; LUCZY, J.; SABOL, F.; BJORDAL, J. M. Should open excisions and sutured incisions be treated differently? A review and meta-analysis of animal wound models following low-level laser therapy. **Lasers in Medical Science**, p. 1–12, 2018.

GAO, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, L.; WU, G. Effects of intraplantar injection of carrageenan on central dopamine release. **Brain Research**, v. 54, n. 4, p. 391–394, 2001.

GE, Z.; ZENG, Y.; TAN, Y. Effects of intrathecal 6-hydroxydopamine, α 1 and α 2 adrenergic receptor antagonists on antinociception of propofol in mice. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 2, p. 186–191, 2005.

GENCER, A.; GUNDUZ, O.; ULUGOL, A. Involvement of Descending Serotonergic and Noradrenergic Systems and their Spinal Receptor Subtypes in the Antinociceptive Effect of Dipyrone. **Drug Res (Stuttg)**, v. 65, n. 12, p. 645–9, 2015.

GODIN, A. G.; RODEAU, J.; MESNAGE, B.; HAMMER, M.; ENGELHARDT, J. Von; WISEMAN, P. W.; KONINCK, Y. De. Morphological and Functional Characterization of Cholinergic Interneurons in the Dorsal Horn of the Mouse Spinal Cord. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 519, p. 3139–3158, 2011.

GOLDBERG, D. S. Pain, objectivity and history: understanding pain stigma. **BMJ**, v. 43, n. 4, p. 238–243., 2017.

GONZALEZ-LIMA, F.; ROJAS. Low-level light therapy of the eye and brain. **Eye and Brain**, p. 49, 2011. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/low-level-light-therapy-of-the-eye-and-brain-peer-reviewed-article-EB>>.

GOTOH, Y.; ANDOH, T.; KURAIISHI, Y. Neuropharmacology Noradrenergic regulation of itch transmission in the spinal cord mediated by α -adrenoceptors. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 4, p. 825–831, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.05.030>>.

GRACE, P. M.; ROLAN, P. E.; HUTCHINSON, M. R. Brain, Behavior, and Immunity Peripheral immune contributions to the maintenance of central glial activation underlying neuropathic pain. **Brain Behavior and Immunity**, v. 25, n. 7, p. 1322–1332, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2011.04.003>>.

GUILLOT, X.; SEMERANO, L.; DECKER, P.; FALGARONE, G.; BOISSIER, M. Pain and immunity. **Joint Bone Spine**, v. 79, n. 3, p. 228–236, 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2011.10.008>>.

HAGIWARA, S.; IWASAKA, H.; OKUDA, K.; NOGUCHI, T. GaAIIAs (830 nm) Low-Level Laser Enhances Peripheral Endogenous Opioid Analgesia in Rats. **Lasers Surg Med.**, v. 39, n. 10, p. 797–802, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/lsm.20583>>.

HAMBLIN, M. R. Shining light on the head: Photobiomodulation for brain disorders. **BBA-Clinical**, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.09.002>>.

HAMBLIN, M. R. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 94, n. 1, p. 199–212, 2018.

HAMBLIN, M. R.; DEMIDOVA, T. N. Mechanisms of low level light therapy. **Proc. of SPIE**, v. 6140, p. 614001, 2006. Disponível em: <<http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.646294>>.

HAN, Z.; FANG, Q.; WANG, Z.; LI, X.; LI, N.; CHANG, X.; PAN, J.; TANG, H.; WANG, R. Antinociceptive Effects of Central Administration of the Endogenous Cannabinoid Receptor Type 1 Agonist VDPVNFKLLSH-OH [(m) VD-hemopressin (α)], an N-Terminally Extended Hemopressin Peptide. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 348, n. 2, p. 316–323, 2014.

HEINRICHER, M. M.; TAVARES, I.; LEITH, J. L.; LUMB, B. M. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 214–225, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.009>>.

HEISKANEN, V.; HAMBLIN, M. R. Photobiomodulation: lasers vs. light emitting diodes? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1003–1017, 2018.

HENNESSY, M.; HAMBLIN, M. R. Photobiomodulation and the brain: a new paradigm. **J Opt.**, v. 19, n. 1, p. 013003, 2018.

HERRADON, G.; EZQUERRA, L.; NGUYEN, T.; WANG, C.; SISO, A.; FRANKLIN, B.; DILORENZO, L.; ROSSENFELD, J.; SILOS-SANTIAGO, I.; ALGUACIL, L. F. Noradrenergic and opioidergic alterations in neuropathy in different rat strains. **Neuroscience Letters**, v. 438, p. 186–189, 2008.

HORNFELDT, C. S.; KITTO, K. F.; LARSON, A. A. Evidence that the NH₂-terminus of substance P modulates IV-methyl-D-aspartate-induced activity by an action involving sigma receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 306, p. 15–22, 1996.

HOU, S.; CARSON, D. M.; WU, D.; KLAU, M. C.; HOULÉ, J. D.; TOM, V. J. Dopamine is produced in the rat spinal cord and regulates micturition reflex after spinal cord injury. **Experimental Neurology**, v. 285, p. 136–146, 2016.

HSIEH, Y.; HONG, C.; CHOU, L. Fluence-dependent effects of low-level laser therapy in myofascial trigger spots on modulation of biochemicals associated with pain in a rabbit model. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 1, p. 209–216, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10103-014-1654-9>>.

HUANG, Y.-Y.; SHARMA, S. K.; CARROLL, J.; HAMBLIN, M. R. Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy – an Update. **Dose-Response**, v. 9, n. 4, p. 602–18, 2011. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.2203/dose-response.11-009.Hamblin>>.

HUANG, Y. Y.; CHEN, A. C. H.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy. **Dose-Response**, v. 7, n. 4, p. 358–83, 2009. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.2203/dose-response.09-027.Hamblin>>.

HUNG, K.; WU, H.; MIZOGUCHI, H.; LEITERMANN, R.; TSENG, L. F. Intrathecal Treatment With 6-Hydroxydopamine or 5,7-Dihydroxytryptamine Blocks the Antinociception Induced by Endomorphin-1 and Endomorphin-2 Given Intracerebroventricularly in the Mouse. **J Pharmacol Sci**, v. 93, n. 3, p. 299–306, 2003.

IBRAHIM, M. M.; PATWARDHAN, A.; GILBRAITH, K. B.; MOUTAL, A.; YANG, X.; CHEW, L. A.; MALAN, T. P.; TODD, W.; PORRECA, F.; KHANNA, R. Long-lasting antinociceptive effects of green light in acute and chronic pain in rats. **Pain**, v. 158, n. 2, p. 347–360, 2018.

ILIC, S.; LEICHLITER, S.; STREETER, J.; ORON, A.; DETABOADA, L.; ORON, U. Effects of Power Densities, Continuous and Pulse Frequencies, and Number of Sessions of Low-Level Laser Therapy on Intact Rat Brain. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 4, p. 458–466, 2006.

JAÄÄSKELAÄÄINEN, SATU K. RINNE, J. O.; FORSELL, H.; TENOVUO, O.; KAASINEN, V.; JA, S. K.; SONNINEN, P. Role of the dopaminergic system in chronic pain - a fluorodopa -PET study. **Pain**, v. 90, p. 257–260, 2001.

JENKINS, P. A.; CARROLL, J. D. How to Report Low-Level Laser Therapy (LLLT)/Photomedicine Dose and Beam Parameters in Clinical and Laboratory Studies. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 12, p. 785–787, 2011. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/pho.2011.9895>>.

JENSEN, T. S.; BARON, R.; HAANPÄÄ, M.; KALSO, E.; LOESER, J. D.; RICE, A. S. C.; TREEDE, R. A new definition of neuropathic pain. **Pain**, v. 152, n. 10, p. 2204–2205, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2011.06.017>>.

JEONG, S. H.; HEO, B. H.; PARK, S. H.; KIM, W. M.; LEE, H. G.; YOON, M. H.; CHOI, J. II. Spinal Noradrenergic Modulation and the Role of the Alpha-2 Receptor in the Antinociceptive Effect of Intrathecal Nefopam in the Formalin Test. **The Korean Journal of Pain**, v. 27, n. 1, p. 23–29, 2014.

JIANG, Y.-Y.; SHAO, S.; ZHANG, Y.; ZHENG, J.; CHEN, X.; CUI, S.; YI, M. Neural Pathways in Medial Septal Cholinergic Modulation of Chronic Pain: Distinct Contribution of Anterior Cingulate Cortex and Ventral Hippocampus Authors: Ying-Ying Jiang. **Pain**, v. 159, n. 3, 2018.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203–210, 13 set. 2001. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/35093019>>.

KARU, T. Photobiology of Low-Power Laser Effects. **Health Phys**, v. 56, n. 5, p. 691–

704, 1989.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 49, p. 1–17, 1999.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; KOLYAKOV, S. F.; AFANASYEVA, N. I. Absorption Measurements of Cell Monolayers Relevant to Mechanisms of Laser Phototherapy: Reduction or Oxidation of Cytochrome c Oxidase. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 6, p. 593–599, 2008.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; AFANASYEVA, N. I. Cellular Effects of Low Power Laser Therapy Can be Mediated by Nitric Oxide. v. 314, n. February, p. 307–314, 2005.

KHUMAN, J.; ZHANG, J.; PARK, J.; CARROLL, J. D. Low-Level Laser Light Therapy Improves Cognitive Deficits and Inhibits Microglial Activation. **Journal of Neurotrauma**, v. 29, n. 2, p. 408–417, 2012.

KIBALY, C.; LOH, H. H.; LAW, P. A Mechanistic Approach to the Development of Gene Therapy for Chronic Pain. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 327, p. 89–161, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.06.002>>.

KIGUCHI, N.; KOBAYASHI, D.; SAIKA, F.; MATSUZAKI, S.; KISHIOKA, S. Pharmacological Regulation of Neuropathic Pain Driven by Inflammatory Macrophages. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 1, n. 18, 2017.

KIM, H. P. Lightening up Light Therapy: Activation of Retrograde Signaling Pathway by Photobiomodulation. **Biomolecules Therapeutics**, v. 22, n. 6, p. 491–496, 2014.

KIM, J.; HAM, S.; HONG, H.; MOON, C.; IM, H. Brain Reward Circuits in Morphine Addiction. **Molecules and Cells**, v. 39, n. 9, p. 645–653, 2016a.

KIM, W.; KIM, M. J.; GO, D.; MIN, B.; NA, H. S.; KIM, S. K. Combined Effects of Bee Venom Acupuncture and Morphine on Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain in Mice. **Toxins**, v. 8, n. 2, p. 33, 2016b.

KNAUL, F. M.; FARMER, P. E.; KRAKAUER, E. L.; LIMA, L. De; BHADELIA, A.; KWETE, X. J.; ARREOLA-ORNELAS, H. Alleviating the access abyss in palliative care and pain relief — an imperative of universal health coverage: the Lancet Commission report. **The Lancet**, v. 391, n. 10128, p. 1391–1454, 2017.

KREMER, M.; YALCIN, I.; GOUMON, Y.; WURTZ, X.; NEXON, L.; DANIEL, D.; MEGAT, S.; CEREDIG, R. A.; ERNST, C.; TURECKI, G.; CHAVANT, V.; THEROUX, J.-F.; LACAUD, A.; JOGANAH, L.; LELIEVRE, V.; MASSOTTE, D.; LUTZ, P.-E.; GILSBACH, R.; SALVAT, E.; BARROT, M. A dual noradrenergic mechanism for the relief of neuropathic allodynia by the antidepressant drugs duloxetine and amitriptyline. **The Journal of Neuroscience**, v. 46, n. 38, p. 9934–9954, 2018.

KWON, Y. B.; HAMB, T. W.; KIM, H. W.; ROHB, D. H.; YOONB, S. Y.; HANC, H. J.; YANG, I. S.; KIM, K. W.; BEITZ, A. J.; LEEB, J. H. Water soluble fraction (b 10 kDa) from bee venom reduces visceral pain behavior through spinal a 2 -adrenergic activity in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 80, p. 181–187, 2005.

KWON, Y.; KANG, M.; AHN, C.; HAN, H.; AHN, B.; LEE, J.; NATIONAL, S.; KOREA, S. Effect of high or low frequency electroacupuncture on the cellular activity of catecholaminergic neurons in the brainstem. **Acupunct Electrother Res.**, v. 25, n. 1, p. 27–36, 2000.

KYRANOU, M.; PUNTILLO, K. The transition from acute to chronic pain: might intensive care unit patients be at risk? **Annals of Intensive Care**, v. 2, n. 1, p. 1, 2012. Disponível em: <Annals of Intensive Care>.

LAAKSO, E.; CABOT, P. J. Nociceptive Scores and Endorphin-Containing Cells Reduced by Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Inflamed Paws of Wistar Rat. **Photomed Laser Surg.**, v. 23, n. 1, p. 32–35, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1089/pho.2005.23.32>>.

LI, Z.; CARON, M. G.; BLAKELY, R. D.; MARGOLIS, K. G.; GERSHON, M. D. Dependence of Serotonergic and Other Nonadrenergic Enteric Neurons on Norepinephrine Transporter Expression. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 49, p. 16730–16740, 2010.

LIEBERT, A. D.; CHOW, R. T.; BICKNELL, B. T.; VARIGOS, E. Neuroprotective effects against POCD by photobiomodulation: Evidence from assembly/disassembly of the cytoskeleton. **Journal of Experimental Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2016.

LLORCA-TORRALBA, M.; BORGES, G.; NETO, F.; MICO, J. A.; BERROCOSO, E. REVIEW NORADRENERGIC LOCUS COERULEUS PATHWAYS IN PAIN MODULATION. **Neuroscience**, n. June, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.057>>.

LLORCA-TORRALBA, M.; SUÁREZ-PEREIRA, I.; BRAVO, L.; CAMARENA-DELGADO, C.; GARCIA-PARTIDA, J. A.; MICO, J. A.; BERROCOSO, E. Chemogenetic Silencing of the Locus Coeruleus – Basolateral Amygdala Pathway Abolishes Pain-Induced Anxiety and Enhanced Aversive Learning in Rats. **Biological Psychiatry**, v. 85, n. 15, p. 1021–1035, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.02.018>>.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology q. v. 137, p. 473–477, 2008.

LUMPKIN, E. A.; CATERINA, M. J. Mechanisms of sensory transduction in the skin. **Nature**, v. 445, n. 22, p. 858–65, 2007.

MARKOVIC, A. B.; TODOROVIĆ, L. Postoperative analgesia after lower third molar surgery: contribution of the use of long-acting local anesthetics, low-power laser, and diclofenac. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 102, n. 5, p. e4–8, 2006.

MARTIUS F. Das Amdt-Schulz Grandgesetz. **Munch Med Wschr.** v. 70, p. 1005–1006, 1923.

MCCALL, J. G.; SIUDA, E. R.; BHATTI, D. L.; LAWSON, L. A.; MCELLIGOTT, Z. A.; STUBER, G. D.; BRUCHAS, M. R. Locus coeruleus to basolateral amygdala noradrenergic projections promote anxiety-like behavior. **Elife**, v. 14, n. 6, p. e18247, 2017.

MEENTS, J. E.; FISCHER, M. J. M.; MCNAUGHTON, P. A. Sensitization of TRPA1 by Protein Kinase A. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0170097, 2017.

MELZACK, R. Pain – an overview. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 43, p. 880–884, 1999.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain Mechanisms: A New Theory. **Science**, v. 150, n. 3699, 1965.

MENDIGUREN, A.; AOSTRI, E.; PINEDA, J. Regulation of noradrenergic and serotonergic systems by cannabinoids: relevance to cannabinoid-induced effects. **Life Sciences**, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.029>>.

MEYNAGHIZADEH-ZARGAR, R.; SADIGH-ETEGHAD, S.; MOHADDES, G.; SALEHPOUR, F.; RASTA, S. H. Effects of transcranial photobiomodulation and methylene blue on biochemical and behavioral profiles in mice stress model. **Lasers in Medical Science**, n. Aug 1, 2019.

MILLAN, M. J. The induction of pain: An integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1–164, 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 355–474, 2002.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress in Neurobiology**, v. 70, p. 83–244, 2003.

MILLAN, M. J.; NEWMAN-TANCREDI, A.; RIVET, J.; BROCCO, M.; LACROIX, P.; AUDINOT, R. I. E.; CISTARELLI, L.; GOBERT, A. S 15535 , A Novel Benzodioxopiperazine Ligand of Serotonin (5-HT) 1A Receptors : I . Interaction with Cloned Human (h) 5- HT 1A , Dopamine hD 2/hD 3 and h α 2A -Adrenergic Receptors in Relation to Modulation of Cortical Monoamine Release and Activit. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 282, n. 1, p. 132–147, 1997.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat Rev Neurosci.**, v. 10, n. 1, p. 23–36, 2009.

MIZOGUCHI, H.; TAKAGI, H.; WATANABE, C.; YONEZAWA, A. Involvement of multiple α -opioid receptor subtypes on the presynaptic or postsynaptic inhibition of spinal pain transmission. **Peptides**, v. 51, p. 15–25, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2013.10.012>>.

MOAYEDI, M.; DAVIS, K. D. Theories of pain: from specificity to gate control Theories of pain: from specificity to gate control. **Journal Neurophysiology**, v. 109, p. 5–12, 2013.

MOCHIZUKI-ODA, N.; KATAOKA, Y.; CUI, Y.; YAMADA, H.; HEYA, M.; KUNIO, A. Effects of near-infra-red laser irradiation on adenosine triphosphate and adenosine diphosphate contents of rat brain tissue. **Neuroscience Letters**, v. 323, n. 3, p. 207–210, 2002.

MORADI, M.; YAZDANIAN, M.; HAGHPARAST, A. Role of dopamine D2-like receptors within the ventral tegmental area and nucleus accumbens in antinociception induced by lateral hypothalamus stimulation. **Behavioural Brain Research**, v. 292, p.

508–514, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.07.007>>.

MORGADO, C.; SILVA, L.; PEREIRA-TERRA, P.; TAVARES, I. Changes in serotonergic and noradrenergic descending pain pathways during painful diabetic neuropathy: The preventive action of IGF1. **Neurobiology of Disease**, v. 43, n. 1, p. 275–284, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2011.04.001>>.

NAKAMOTO, K.; NISHINAKA, T.; SATO, N.; AIZAWA, F.; YAMASHITA, T.; MANKURA, M.; KOYAMA, Y.; KASUYA, F.; TOKUYAMA, S. The activation of supraspinal GPR40/FFA1 receptor signalling regulates the descending pain control system. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 5, p. 1250–1262, 2015.

NAKAMURA, M.; NISHIWAKI, Y.; SUMITANI, M.; USHIDA, T.; YAMASHITA, T.; SHINICHI, K.; TOSHIHIKO, T.; TOYAMA, Y. Investigation of chronic musculoskeletal pain (third report): with special reference to the importance of neuropathic pain and psychogenic pain. **J Orthop Sci**, v. 19, p. 667–675, 2014.

NEVES, L. M. S.; GONÇALVES, E. C. D.; CAVALLI, J.; VIEIRA, G.; LAURINDO, L. R.; SIMÕES, R. R.; COELHO, I. S.; SANTOS, A. R. S.; MARCOLINO, A. M.; COLA, M.; DUTRA, R. C. Photobiomodulation Therapy Improves Acute Inflammatory Response in Mice : the Role of Cannabinoid Receptors / ATP-Sensitive K + Channel / p38-MAPK Signalling Pathway. **Mol Neurobiol.**, v. 55, n. 7, p. 5580–5593, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12035-017-0792-z>>.

OBATA, H. Analgesic Mechanisms of Antidepressants for Neuropathic Pain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. E2483, 2017.

OHKUBO, N.; AOTO, M.; KON, K.; MITSUDA, N. Lack of zinc finger protein 521 upregulates dopamine β -hydroxylase expression in the mouse brain, leading to abnormal behavior. **Life Sciences**, v. 231, n. 15, p. 116559, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116559>>.

OKAZAKI, R. The Antiallodynic Effect of Neurotrophin® Is Mediated via Activation of Descending Pain Inhibitory Systems in Rats with Spinal Nerve Ligation. **Anesthesia & Analgesia**, v. 107, n. 3, p. 2–7, 2008.

OLAUSSON, H.; WESSBERG, J.; MCGLONE, F.; VALLBO, A. Neuroscience and Biobehavioral Reviews The neurophysiology of unmyelinated tactile afferents. **Neuroscience and Biobehavioral**, v. 34, n. 2, p. 185–191, 2010.

OLIVERAS, J.; BESSON, J. Stimulation-produced analgesia in animals: behavioural investigations. **Prog Brain Res**, v. 77, p. 141–157, 1988.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3779–87, 2010.

OSSIPOV, M. H.; LOPEZ, Y.; BIAN, D.; NICHOLS, M. L.; PORRECA, F. Synergistic Antinociceptive Interactions of Morphine and Clonidine in Rats with Nerve-ligation Injury. **Anesthesiology**, v. 86, n. 1, p. 196–204, 1997.

OSSIPOV, M. H.; MORIMURA, K.; PORRECA, F. Descending pain modulation and chronification of pain Michael. **Curr Opin Support Palliat Care**, v. 8, n. 2, p. 143–151, 2015.

- OSSIPOV, M. H.; PORRECA, F. Descending Modulation of Pain. **IASP Press**, 2005.
- OUESLATI, A.; LOVISA, B.; PERRIN, J.; WAGNIÈRES, G.; VAN DEN BERGH, H.; TARDY, Y.; LASHUEL, H. A. Photobiomodulation suppresses alpha-synuclein-induced toxicity in an AAV-based rat genetic model of Parkinson's disease. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–13, 2015.
- PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. San Diego: Academic Press, 2nd edition, 2001
- PENG, F.; QU, Z.; QIU, C.; LIAO, M.; HU, W. Spinal vasopressin alleviates formalin-induced nociception by enhancing GABAA receptor function in mice. **Neuroscience Letters**, p. 1–5, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2015.03.023>>.
- PEREIRA, F. C.; PARISI, J. R.; MAGLIONI, Ã. C. B.; MACHADO, G. B.; BARRAG, P.; SILVA, J. R. T.; SILVA, M. L. Antinociceptive Effects of Low-Level Laser Therapy at 3 and 8 j/cm² in a Rat Model of Postoperative Pain: Possible Role of Endogenous Opioids. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 49, n. 9, p. 844–851, 2017.
- PERL, E. R. Ideas about pain, a historical view. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, p. 71–80, 2007.
- PERL, E. R. Pain Mechanisms: A Commentary on Concepts and Issues. **Progress in Neurobiology**, v. 94, n. 1, p. 20–38, 2012.
- PERTOVAARA, A. Noradrenergic pain modulation. **Progress in Neurobiology**, v. 80, p. 53–83, 2006.
- PETHO, G.; REEH, P. W. Sensory and Signaling Mechanisms of Bradykinin, Eicosanoids, Platelet-Activating Factor, and Nitric Oxide in Peripheral Nociceptors. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 4, p. 1699–1775, 2012. Disponível em: <<http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00048.2010>>.
- PHILLIPS, S.; GELGOR, L.; MITCHELL, D. Antinociceptive action of dopamine agonists in the nucleus raphe magnus of rats is mediated by D2 receptors. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 319, p. 66–75, 1992.
- PIGATTO, G. R. **Terapia de emissão de luz por diodo induz analgesia em modelos de nocicepção em camundongos: análise do mecanismo de ação**. Diode light emission therapy induces analgesia in nociception models in mice: analysis of the mechanism of action. 2015. Federal University of Santa Maria, 2015.
- PIGATTO, G. R.; AGNE, J. E.; BAUERMAN, L. D. F.; FERREIRA, J.; TREVISAN, G.; FREITAS, R. B. De; ROSA, F. Study of infrared light emitting diodes infrared on neuropathic pain in rats. **Fisioterapia Brasil**, v. 14, n. 4, p. 274–282, 2013.
- PIGATTO, G. R.; COELHO, I. S.; AQUINO, R. S.; BAUERMAN, L. F.; SANTOS, A. R. S. Light-Emitting Diode Phototherapy Reduces Nocifensive Behavior Induced by Thermal and Chemical Noxious Stimuli in Mice: Evidence for the Involvement of Capsaicin-Sensitive Central Afferent Fibers. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 5, p. 3205–3218, 7 abr. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-9887-1>>.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; JR, W. A. V.; CHIU, I. M.; MEDICAL, H.; ESTADUAL, U.; LONDRINA, D. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends Immunol.**, v. 38, n. 1, p. 5–19, 2018.

POLLACK, G. H. Cell electrical properties : reconsidering the origin of the electrical potential. **Cell Biology International**, v. 9999, p. 1–6, 2014.

PRICE, J.; MUDGE, A. W. Price, J., & Mudge, A. W. (1983). A subpopulation of rat dorsal root ganglion neurones is catecholaminergic. **Nature**, v. 301, p. 241–243, 1983.

PURUSHOTHUMAN, S.; JOHNSTONE, D. M.; NANDASENA, C.; MITROFANIS, J.; STONE, J. Photobiomodulation with near infrared light mitigates Alzheimer's disease-related pathology in cerebral cortex—evidence from two transgenic mouse models. **Alzheimer's research & therapy**, v. 6, n. 1, p. 1, 2014.

RADNOVICH, R.; CHAPMAN, C. R.; GUDIN, J. A.; PANCHAL, S. J.; WEBSTER, L. R.; PERGOLIZZI, J. J. V. Acute Pain: Effective Management Requires Comprehensive Assessment. **Postgraduate Medicine ISSN:**, v. 5481, p. 1941–9260, 2015.

REIDENBERG, M. M. World Health Organization Program for the Selection and Use of Essential Medicines. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 81, n. 4, p. 603–606, 2007.

REINHART, F.; MASSRI, N. EI; DARLOT, F.; TORRES, N.; JOHNSTONE, D. M.; CHABROL, C.; COSTECALDE, T.; STONE, J.; MITROFANIS, J.; BENABID, A. L.; MORO, C. 810nm near-infrared light offers neuroprotection and improves locomotor activity in MPTP-treated mice. **Neuroscience Research**, v. 92, p. 86–90, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2014.11.005>>.

REINHART, F.; MASSRI, N. EI; TORRES, N.; CHABROL, C.; MOLET, J.; JOHNSTONE, D. M.; STONE, J.; BENABID, A. L.; MITROFANIS, J.; MORO, C. The behavioural and neuroprotective outcomes when 670 nm and 810 nm near infrared light are applied together in MPTP-treated mice. **Neuroscience Research**, v. 117, p. 42–47, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2016.11.006>>.

RICHARDSON, J. D.; VASKO, M. R. Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 302, n. 3, p. 839–845, 2002.

ROELANDTS. A new light on Niels Finsen, a century after his nobel prize. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, n. 4, p. 115–117, 2005.

SALEHPOUR, F.; MAHMOUDI, J.; KAMARI, F.; SADIGH-ETEGHAD, S.; RASTA, S. H.; HAMBLIN, M. R. Brain Photobiomodulation Therapy: a Narrative Review. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 8, p. 6601–6636, 2018.

SANOJA, R.; VANEGAS, H.; TORTORICI, V. Critical Role of the Rostral Ventromedial Medulla in Early Spinal Events Leading to Chronic Constriction Injury Neuropathy in Rats. **The Journal of Pain**, v. 9, n. 6, p. 532–42, 2008.

SANTOS, P. L.; BRITO, R. G.; MATOS, J. P. S. C. F.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Fos Protein as a Marker of Neuronal Activity: a Useful Tool in the Study of the Mechanism of Action of Natural Products with Analgesic Activity. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 6, p. 4560–4579, 2018.

SCHAIBLE, H. Peripheral and Central Mechanisms of Pain Generation. **Handb Exp Pharmacol.**, v. 177, p. 3–28, 2007.

SCHAIBLE, H. Nociceptive neurons detect cytokines in arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 5, p. 470, 2014.

SCHUBERT, E. F. **Light-Emitting Diodes**. 2nd edition. New York: Cambridge University Press, 2006.

SERGIO, L. P. D. S.; SILVA, A. P. A. Da; AMORIM, P. F.; CAMPOS, V. M. A.; MAGALHÃES, L. A. G.; DE PAOLI, F.; DE SOUZA DA FONSECA, A. DNA damage in blood cells exposed to low-level lasers. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 361–368, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/lsm.22344>>.

SERRA E PERES, A.; ASHMAWI, H. A. Influence of Naloxone and Methysergide on the Analgesic Effects of Low-Level Laser in an Experimental Pain Model. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 60, n. 3, p. 302–310, 2010. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0034-7094\(10\)70037-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0034-7094(10)70037-4)>.

SIAHPOSHT-KHACHAKI, A.; POURREZA, P.; EZZATPANAH, S.; HAGHPARAST, A. Nucleus accumbens dopamine receptors mediate hypothalamus-induced antinociception in the rat formalin test. **Eur J Pain.**, v. 21, n. 7, p. 1285–1294, 2017.

SILVA, M. L.; SILVA, J. R. T.; PRADO, W. A. Analgesia induced by 2- or 100-Hz electroacupuncture in the rat tail- flick test depends on the anterior pretectal nucleus. **Life Sciences**, v. 93, n. 20, p. 742–754, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.09.012>>.

SIM, Yu. B.; PARK, S. H.; KANG, Y. J.; KIM, S. S.; KIM, C. H.; KIM, S. J.; JUNG, J. S.; RYU, O. H.; CHOI, M. G.; SUH, H. W. Effect of GABA Receptor Agonists or Antagonists Injected Spinally on the Blood Glucose Level in Mice. **Neurochem Res**, v. 38, p. 1055–1062, 2013.

SOUSA-VALENTE, J.; BRAIN, S. D. A historical perspective on the role of sensory nerves in neurogenic inflammation. **Seminars in Immunopathology**, v. 40, p. 229–236, 2018.

SOUSA, M. V. P. de; FERRARESI, C.; HAMBLIN, A. C. de M. E. M. Y. M. R. Building, testing and validating a set of home-made von Frey filaments: a precise, accurate and cost effective alternative for nociception assessment. **J Neurosci Methods**, v. 232, n. 30, p. 1–5, 2014.

SOUSA, M. V. P. de; KAWAKUBO, M.; FERRARESI, C.; KAIPPERT, B.; YOSHIMURAC, E. M.; HAMBLIN, M. R. Pain management using photobiomodulation: Mechanisms, location, and repeatability quantified by pain threshold and neural biomarkers in mice. **J Biophotonics.**, v. 11, n. 7, p. e201700370, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jbio.201700370>>.

SUTHERLAND, J. C. Biological Effects of Polychromatic Light ¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, n. 2, p. 164–170, 2002.

TAKAHASHI, A.; SHIMAMOTO, A.; BOYSON, C. O.; DEBOLD, J. F.; MICZEK, K. A. GABA B Receptor Modulation of Serotonin Neurons in the Dorsal Raphe ´ Nucleus and Escalation of Aggression in Mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 35, p.

11771–11780, 2010.

TAKASU, K.; HONDA, M.; ONO, H.; TANABE, M. Spinal α 2-adrenergic and muscarinic receptors and the NO release cascade mediate supraspinally produced effectiveness of gabapentin at decreasing mechanical hypersensitivity in mice after partial nerve injury. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, p. 233–244, 2006.

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

TEDORE, T.; WEINBERG, R.; WITKIN, L.; GIAMBRONE, G. P.; FAGGIANI, S. L.; FLEISCHUT, P. M. A c u t e P a i n M a n a g e m e n t / Regional Anesthesia Acute pain Regional anesthesia Management Patient satisfaction Costs. **Anesthesiology Clinics**, v. 33, n. 4, p. 739–751, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anclin.2015.07.005>>.

TODD, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nat Rev Neurosci.**, v. 11, n. 12, p. 823–836, 2012.

TRACEY, I.; JOHNS, E. The pain matrix : Reloaded or reborn as we image tonic pain using arterial spin labelling. **Pain**, v. 148, n. 3, p. 359–360, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2009.11.009>>.

TREEDE, R.; RIEF, W.; BARKE, A.; AZIZ, Q.; BENNETT, M. I.; BENOLIEL, R.; KOSEK, E.; LAVAND, P.; NICHOLAS, M.; PERROT, S.; SCHOLZ, J.; SCHUG, S.; SMITH, B. H.; SVENSSON, P.; VLAEYEN, J. W. S.; WANG, S. A classification of chronic pain for ICD-11. **Pain**, v. 156, n. 6, p. 1003–1007, 2015.

TSAI, S.; HAMBLIN, M. R. Biological effects and medical applications of infrared radiation. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 170, n. April, p. 197–207, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.04.014>>.

UMANA, I. C.; DANIELE, C. A.; MILLER, B. A.; ABBURI, C.; BROWN, M. A.; MASON, P.; MCGEHEE, D. S. Nicotinic Modulation of Descending Pain Control Circuitry. **Pain**, v. 158, n. 10, p. 1938–1950, 2017.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: Inhibitory or facilitatory? **Brain Research Reviews**, v. 46, n. 3, p. 295–309, 2004.

VAS, K.; BESENYI, Z.; URBÁN, S.; BADAWI, A.; PÁVICS, L.; ERŐS, G.; KEMÉNY, L. Efficacy and safety of long pulse 1064 and 2940 nm lasers in noninvasive lipolysis and skin tightening. **J Biophotonics**, v. 12, n. 9, p. e201900083, 2019.

VLADIMIROV, Y. A.; OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry (Mosc)**, v. 69, n. 1, p. 81–90, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14972023>>.

VOSCOPOULOS, C.; LEMA, M. When does acute pain become chronic? **British Journal of Anaesthesia**, v. 105, p. i69–i85, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/bja/aeq323>>.

WALKER, J. Relief From Chronic Pain By Low Power Laser Irradiation. **Neuroscience**

Letters, v. 43, n. 2–3, p. 339–344, 1983.

WALØEN, K.; KLEPPE, R.; MARTINEZ, A.; HAAVIK, J. Tyrosine and tryptophan hydroxylases as therapeutic targets in human disease. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 21, n. 2, p. 167–180, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14728222.2017.1272581>>.

WANG, S.; DAI, Y.; FUKUOKA, T.; YAMANAKA, H.; KOBAYASHI, K.; OBATA, K.; CUI, X.; TOMINAGA, M.; NOGUCHI, K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: A molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain**, v. 131, n. 5, p. 1241–1251, 2008.

WANG, X.; DMOCHOWSKI, J. P.; ZENG, L.; KALLIONIEMI, E.; HUSAIN, M.; GONZALEZ-LIMA, F.; LIU, H. Transcranial photobiomodulation with infrared laser increases power of brain oscillations. **Neurophotonics**, v. 6, n. 2, p. 025013, 2019.

WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization. 2007. Disponível em: <www.who.int>. Acesso em: 25 jun. 2018.

WHO. **Essential medicines and health products**. Disponível em: <www.who.int>. Acesso em: 25 jun. 2018.

WHO. **Report of the WHO Expert Committee: The Selection and Use of Essential Medicines**. . Disponível em: <www.who.int>. Acesso em: 5 jun. 2020.

WILLIS, W. D. Nociceptive Pathways: Anatomy and Physiology of Nociceptive Ascending Pathways. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sc**, v. 308, n. 19, p. 253–268, 1985.

WILLIS, W. D. Anatomy and physiology of descending control of nociceptive responses of dorsal horn neurons: comprehensive review. **Prog Brain Res**, v. 77, p. 1–29, 1988.

WILLIS, W.; WESTLUND, K. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. **J Clin Neurophysiol.**, v. 14, n. 1, p. 2–31, 1997.

WINSTEIN, C.; REQUEJO, P. Innovative Technologies for Rehabilitation and Health Promotion: What Is the Evidence? **Physical Therapy**, v. 95, n. 3, p. 294–298, 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ptj/article-lookup/doi/10.2522/ptj.2015.95.2.294>>.

WOOD, P. B.; SCHWEINHARDT, P.; JAEGER, E.; DAGHER, A.; HAKYEMEZ, H.; RABINER, E. A.; BUSHNELL, M. C.; CHIZH, B. A. Fibromyalgia patients show an abnormal dopamine response to pain. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 3576–3582, 2007.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **The Journal of Clinical Investigation** <http://www.jci.org>, v. 120, n. 11, p. 3742–4, 2010.

YAN, W.; CHOW, R.; ARMATI, P. J. Inhibitory effects of visible 650-nm and infrared 808-nm laser irradiation on somatosensory and compound muscle action potentials in rat sciatic nerve: implications for laser-induced analgesia. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 36, p. 130–135, 2011.

YAZDI-RAVANDI, S.; RAZAVI, Y.; HAGHPARAST, A.; GOUDARZVAND, M.; HAGHPARAST, A. Pharmacology , Biochemistry and Behavior Orexin A induced antinociception in the ventral tegmental area involves D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 126, p. 1–6, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2014.08.009>>.

YOON, S.; KWON, Y.; KIM, H.; ROH, D.; KANG, S.; KIM, C.; HAN, H.; KIM, K.; YANG, I.; BEITZ, A. J.; LEE, J. Intrathecal neostigmine reduces the zymosan-induced inflammatory response in a mouse air pouch model via adrenomedullary activity: Involvement of spinal muscarinic type 2 receptors. **Neuropharmacology**, v. 49, p. 275–282, 2005.

YOSHIMURA, M.; FURUE, H. Critical Review Mechanisms for the Anti-nociceptive Actions of the Descending Noradrenergic and Serotonergic Systems in the Spinal Cord. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 117, p. 107–117, 2006.

ZARRINDAST, M.; NASSIRI-RAD, S.; PAZOUKI, M. Effects of dopaminergic agents on antinociception in formalin test. **General Pharmacology**, v. 32, p. 517–522, 1999.

ZHANG, J.; DARLING, R. D.; PAUL, I. A.; SIMPSON, K. L.; CHEN, K.; SHIH, J. C.; LIN, R. C. S. Altered Expression of Tyrosine Hydroxylase in the Locus Coeruleus Noradrenergic System in Citalopram Neonatally Exposed Rats and Monoamine Oxidase A Knock Out Mice. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 294, n. 10, p. 1685–1697, 2012.

ZHANG, M. Two-step production of monoamines in monoenzymatic cells in the spinal cord : a different control strategy of neurotransmitter supply? **Neural Regeneration Research**, v. 11, n. 12, p. 1904–1909, 2016.

ZHANG, Q.; MA, H.; NIOKA, S.; CHANCE, B. Study of near infrared technology for intracranial hematoma detection. **Journal of biomedical optics**, v. 5, n. 2, p. 206–213, 2000a.

ZHANG, X.; MCKENNA, D. G.; BRIGGS, C. A. Epibatidine, a nicotinic acetylcholine receptor agonist , inhibits the capsaicin response in dorsal root ganglion neurons. **Brain Research**, v. 919, p. 166–168, 2001.

ZHANG, Y.; CRAGG, S. J. Pauses in Striatal Cholinergic Interneurons: What is Revealed by Their Common Themes and Variations? **Frontiers in Neuroscience**, v. 30, p. 11–80, 2017.

ZHANG, Y.; GAO, X.; HUANG, Y.; WU, G. Expression of 5-HT 1A receptor mRNA in rat dorsal raphe nucleus and ventrolateral periaqueductal gray neurons after peripheral inflammation. **Neuroreport**, v. 11, n. 15, p. 3361–3365, 2000b.

ZHANG, Y.; GAO, X.; YANG, Z.; HUANG, Y.; WU, G. Expression of 5-HT 1A receptor mRNA in rat nucleus raphe magnus neurons after peripheral inflammation. **Brain Research**, v. 887, p. 465–468, 2000c.

ZHANG, Y.; GAO, X.; ZHANG, L.; WU, G. The release of serotonin in rat spinal dorsal horn and periaqueductal gray following carrageenan inflammation. **Neuroreport**, v. 11, n. 16, p. 3539–3543, 2000d.

ANEXOS



Centro Universitário de Araraquara

Rua Voluntários da Pátria, 1309 - Centro - Araraquara - SP
CEP 14801-320 - Caixa Postal 68 - Fone/Fax: (16) 3301-7100

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA - UNIARA
Portaria Ministerial n.º 612 de 15.07.2016
Publicada no D.O.U. de 19.07/2016

www.uniara.com.br

COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Parecer do projeto sob o protocolo: nº.026/16

Título do Projeto: Mecanismo fotobiológico da terapia por diodo emissor de luz na dor neuropática induzida em camundongos

Pesquisador responsável: Glauce Regina Pigatto

PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado "**Mecanismo fotobiológico da terapia por diodo emissor de luz na dor neuropática induzida em camundongos**", sob a orientação e a participação dos docentes Nivaldo Antônio Parizotto (orientador) e Wilton Rogério Lustre (Co-orientador) foi analisado por este Comitê.

O trabalho tem por objetivo geral avaliar o efeito antinociceptivo e neuroregenerativo da LEDT, por meio de modelos de nocicepção aguda e crônica, bem como investigar o possível mecanismo subjacente a este efeito. Serão utilizados camundongos Swiss, fêmeas adultas, submetidas a vários modelos de nocicepção aguda e o modelo crônico. As análises consistirão por testes comportamentais, ensaios bioquímicos e imunológicos, ensaio de Imunoabsorção ligado à enzima, análise histopatológica, imuno-histoquímica, ensaio de Western Blotting e análise eletrofisiológica.


A análise do referido projeto mostra que está devidamente instruído conforme as normas que regulamentam as pesquisas envolvendo animais de experimentação.

Este Comitê apresenta **parecer favorável**, sendo assim, o projeto está **APROVADO** para a sua execução.

Os autores, ao concluírem o trabalho devem encaminhar ao CEUA-UNIARA o Relatório Final de Atividades, na íntegra contendo os resultados e conclusões obtidas.

Araraquara, 10 de outubro de 2016.

Relator/Colegiado

<p>Universidade de Araraquara Comitê de Ética no Uso de Animais</p> <p>Aprovado. Reunião <u>26/09/2016</u></p> <p> Coordenador(a)</p>



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA
FMRP-USP
Comissão de Ética no Uso de Animais
Replacement Reduction Refinement

FMRP
65 anos USP
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Mecanismo fotobiológico da terapia por diodo emissor de luz na dor neuropática induzida em camundongos*”, registrado com o número 131/2017, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 02 de agosto de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 200 camundongos Swiss machos pesando 30g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 02/08/2017 a 10/02/2019.

We certify that the Protocol n° 131/2017, entitled “*Photobiological mechanism of light emitting diode therapy for induced neuropathic pain in mice*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 08/02/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 200 male Swiss mice weighing 30g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 02/10/2019.

Ribeirão Preto, 02 de agosto de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro
Vice-Presidente da CEUA-FMRP – USP,
em exercício