



**UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**BRUNA HOFFMANN DE OLIVEIRA**

**TERAPIA POR DIODO EMISSOR DE LUZ 630 NM REDUZ HIPERALGESIA  
MECÂNICA INFLAMATÓRIA POR MEIO DA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES  
ENDOTELINÉRGICOS / OPIOIDÉRGICOS: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA  
POTÊNCIA EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS**

Palhoça  
2019



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO**

Título da Dissertação

Terapia por diodo emissor de luz 630 nm reduz hiperalgesia mecânica inflamatória por meio da ativação de receptores endotelinérgicos / opioidérgicos: análise da influência da potência em camundongos machos e fêmeas

**BRUNA HOFFMANN DE OLIVEIRA**  
AUTOR

Aprovado pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 29 de julho de 2019.

Doutor Daniel Fernandes Martins (orientador)

Doutor Afonso Shiguemi Inoue Salgado (Avaliador externo - Instituto Salgado de Saúde Integral) – *presente por videoconferência*

Doutora Anna Paula Piovezan (avaliador interno)

*Professor Doutor Jefferson Traebert*

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL**

- Unisul – Universidade do Sul de Santa Catarina – Sede – Reitoria – Av. José Acácio Moreira, 787 – Bairro Dehon – CEP: 88704-900 – Tubarão – Santa Catarina – Fone: (48) 3621.3100
- Campus Universitário de Tubarão – Av. José Acácio Moreira, 787 – Bairro Dehon – CEP: 88704-900 – Tubarão – Santa Catarina – Fone: (48) 3621.3000
- Campus Universitário da Grande Florianópolis – Av. Pedra Branca, 25 – Cidade Universitária Pedra Branca – CEP: 88137-270 – Palhoça – Santa Catarina – Fone: (48) 3279.1000
- Campus Universitário UnisulVirtual – Av. dos Lagos, 41 – Cidade Universitária Pedra Branca – CEP: 88137-100 – Palhoça – Santa Catarina – Fone: (48) 3279.1242

O45 Oliveira, Bruna Hoffmann de, 1988 -

Terapia por diodo emissor de luz 630 nm reduz hiperalgesia mecânica inflamatória por meio da ativação de receptores endotelinérgicos - opioidérgicos : análise da influência da potência em camundongos machos e fêmeas / Bruna Hoffmann de Oliveira. – 2019. 53 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Orientação: Prof. Daniel Fernandes Martins

1. Dor. 2. Fototerapia. 3. Analgesia. 4. Opióides. I. Martins, Daniel Fernandes. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. IV. Título.

CDD (21. ed.) 616.0472

Dedico esse trabalho a minha vó Guacyra  
Andrade Hoffmann (em memória).

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente eu agradeço a Deus, pela oportunidade de viver esses dois anos que foram intensos em conhecimento, trabalho e sabedoria. Agradeço também pelas pessoas que me ajudaram nesse caminho. Pois são essas pessoas que fazem Deus se manifestar através de suas atitudes.

Dessa forma, primeiramente agradeço a minha família, pelo apoio incondicional que aceita minhas escolhas, apenas por saberem da importância delas para mim.

Uma pessoa que sempre me ajudou é a professora Anna Paula Piovezan. Com sua empatia e carinho me trouxe calma e paz em momentos conflituosos e de dúvidas. Suas contribuições a mim e ao meu trabalho foram indispensáveis para que eu chegasse até aqui. Sua forma amorosa, delicada e humana de fazer ciência, são um exemplo para mim.

Já, uma pessoa que o mestrado me trouxe foi a Verônica Vargas, que desde a primeira vez que leu meu trabalho viu possibilidades de crescimento, e desde então me fez correr atrás de tudo aquilo que acredita que sou capaz. Pelas cobranças e chatices, mas também por todos os almoços e caronas científicas, incentivo, conselhos e pela amizade “bloteira”.

As minhas queridas futuras colegas de profissão, as IC's Rafaela e Georgina. Vocês trouxeram tudo de bom que a Naturologia é, a mim e ao meu trabalho.

A Daiana e a Daniela, as doutorandas TOPs!! Por serem e estarem presentes.

E aos demais componentes do LaNEx, afinal somos um grupo.

A participação mais que especial dos meus IC's doutorandos da UFSC, Juliete e Mauricio. Foram domingos de trabalho muito felizes ao lado de vocês.

Ao Mauricio que além de contribuir com a realização desse trabalho é a pessoa que estando do meu lado, torna o caminho mais divertido e mais leve. Sua compreensão, apoio e criatividade foram fundamentais.

Ao Dr. Daniel Fernandes Martins pela sua orientação ao longo desse tempo, onde percebi que entre tuas qualidades profissionais, a de maior destaque é tua capacidade de superação, a qual vai além do aperfeiçoamento intelectual, você

motiva todos a sua volta, possui força, coragem e dedicação para sempre seguir em frente. O amor que tens por aquilo que faz é algo digno de admiração! Dessa forma te agradeço pela oportunidade de trabalhar contigo, pelo incentivo e confiança e pelas cobranças que me fizeram crescer!

Aos animais que foram instrumentos desse trabalho. Meu profundo respeito e valorização por suas vidas.

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

A todos, Muito Obrigada!!!

*“Seja quando comece, é o tempo certo...*

*Quem quer que esteja presente é a pessoa certa...*

*O que quer que aconteça, é a única coisa que poderia ter acontecido...*

*E quando acaba, acaba.”*

*Harrison Owen*

## RESUMO

**Introdução:** Em estudos com LEDT, além do comprimento de onda (em nm), a densidade ou dose de energia (em Joules(J)/cm<sup>2</sup>) é um fator chave; embora dependendo da irradiância [em miliwatts(mW)/cm<sup>2</sup> - que por sua vez depende da potência radiante do dispositivo (em mW)], tempos de irradiação muito diferentes são necessários para produzir a mesma densidade ou dose de energia. Apesar de sua importância, não há estudos que investiguem os efeitos biológicos e mecanismos endógenos provocados por diferentes irradiações de LEDT.

**Objetivos:** Este estudo avaliou o efeito de duas potências da LEDT 630 nm na hiperalgesia mecânica e analisou o papel dos receptores opioides e endotelinérgico-B (R-ET<sub>B</sub>) periféricos em camundongos machos e fêmeas com inflamação na pata.

**Métodos:** Camundongos machos e fêmeas foram avaliados 6h e 96h após injeção intraplantar (i.pl.) do adjuvante completo de Freund (CFA). A hiperalgesia mecânica foi avaliada 30 min após o tratamento com a LEDT 630nm (2J) em duas potências (3.5 mW/cm<sup>2</sup> e 90 mW/cm<sup>2</sup>). Outros camundongos machos e fêmeas foram pré-tratados com naloxona (antagonista opioide) e com Bq-788 (antagonista do R-ET<sub>B</sub>) quinze minutos antes do tratamento com a LEDT ou Sarafotoxina S6c (SRTX S6c, agonista do R-ET<sub>B</sub>). 30 min após a hiperalgesia mecânica foi avaliada. O imunoconteúdo de R-ET<sub>B</sub> da pele da pata dos camundongos machos e fêmeas foi quantificado após o tratamento diário consecutivo até 96h com LEDT.

**Resultados:** A LEDT (90mW/cm<sup>2</sup>) diminuiu a frequência de resposta de camundongos machos e fêmeas, tanto em 6h quanto em 96h após injeção de CFA na pata. A LEDT e a SRTX S6c preveniram o efeito anti-hiperalgésico do Bq-788 e da naloxona, tanto em 6h quanto em 96h após injeção de CFA na pata. No entanto a LEDT não influenciou no imunoconteúdo do R-ET<sub>B</sub> periféricos.

**Conclusão:** Os resultados deste estudo mostram que existe influência da potência no efeito da LEDT e que ativação do R-ET<sub>B</sub> apresenta um importante papel na analgesia opioide periférica induzida pela LEDT.

**Descritores:** Dor. Fototerapia. Receptores para Endotelina. Analgesia opioide.



## ABSTRACT

**Introduction:** In LEDT studies, apart from wavelength (in nanometers - nm), energy density or dose (in Joules(J)/cm<sup>2</sup>) is a key factor; although depending on irradiance [in milliwatts(mW)/cm<sup>2</sup> - which in turn depends on the device's radiant power (in mW)], very different irradiation times are necessary to yield the same energy density or dose. In spite of its importance, there are no studies that investigate the biological effects and endogenous mechanisms elicited by different LEDT irradiances (given a constant treatment dose and wavelength).

**Objectives:** This study evaluated the effect of two different LEDT irradiances (3.5 and 90 mW/cm<sup>2</sup>) – at a wavelength of 630 nm and dose of (2 J/cm<sup>2</sup>) – on mechanical hyperalgesia following CFA i.pl. injection in mice. Additionally, the role of peripheral opioid and endothelin-B receptors (ET<sub>B</sub>-R), as well as the influence of sex was investigated.

**Methods:** Different groups of male or female mice were evaluated 6 and 96 hours after intraplantar (i.pl.) injection of Complete Freund's Adjuvant (CFA). Mechanical hyperalgesia was evaluated 30 min after treatments. Administration of naloxone (an opioid antagonist) or Bq-788 (an ET<sub>B</sub>-R antagonist) fifteen minutes before LEDT or Sarafotoxin S6c (SRTX S6c, ET<sub>B</sub>-R agonist) treatments, helped determine the involvement of peripheral opioid and ET<sub>B</sub>-Rs on LEDT. Lastly, paw skin immunocontent of ET<sub>B</sub>-Rs of both male and female mice was quantified after consecutive daily treatments with LEDT.

**Results:** LEDT at an irradiance of 90mW/cm<sup>2</sup>, increased mechanical threshold in male and female mice, both 6 and 96h after CFA injection, although minor variations in response were observed between sexes. Bq-788 and naloxone administration prevented the effect of LEDT and SRTX S6c; however, LEDT did not influence the immunocontent of peripheral ET<sub>B</sub>-Rs.

**Conclusion:** The results suggest that irradiance influences LEDT effect; and that activation of opioid and ET<sub>B</sub> receptors play an important role in LEDT induced analgesia. Although minor variations in response were observed between sexes, it does not appear that LEDT effects are sex-dependent.

**Keywords:** Pain. Phototherapy.Receptors Endothelin. Opioid analgesia

## LISTAS

Lista de abreviaturas e siglas:

AA - Ácido araquidônico

AINEs - Anti-inflamatórios não-esteroidais

AKT- Proteína quinase B

AMPC – Monofosfato de adenosina cíclico (do inglês, *adenosine monophosphate cyclic*)

ANOVA - Análise de variância (do inglês, *Analysis of variance*)

AP-1 - Proteína ativadora 1

AR - Artrite reumatóide

ATP - Trifosfato de Adenosina (do inglês, *adenosine triphosphate*)

BDNF - O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês, *Brain-derived neurotrophic factor*)

CCO - Citocromo C oxidase

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CFA - Adjuvante Completo de Freund (do inglês, *Complete Freund's Adjuvant*)

CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX – Cicloxigenase

COX-1 – Cicloxigenase tipo 1

COX<sub>2</sub> – Cicloxigenase tipo 2

CPME - Corno Posterior da Medula Espinal

DBCA - Diretrizes Brasileiras de Cuidado utilização de animais para fins científicos e didáticos.

ET - Endotelina

ET<sub>1</sub> - Endotelina-1

ET<sub>2</sub> - Endotelina-2

ET<sub>3</sub> - Endotelina-3

FAPESC - Fundação de Amparo a pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina

FBM – Fotobiomodulação (do inglês, *Photobiomodulation*)

GSNE - Gânglio Sensorial do Nervo Espinal

GTP- Trifosfato de Guanosina (do inglês, *Guanosine triphosphate*).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

HOCL – Ácido hipocloroso

IASP - Associação Internacional para estudo da Dor (do inglês, *International Association for the Study of Pain*)

ICAM - Moléculas de adesão intercelular 1 (do inglês, *intercellular adhesion molecules*)

IL1β - Interleucina 1 beta

IL 6 - Interleucina 6

IL 2 - Interleucina 2

IL 4 - Interleucina 4

IL10 - Interleucina 10

IL 7 - Interleucina 7

IL 8 – Interleucina 8

i.pl. - intraplantar

ip - incisão plantar

i.t. - intratecal

KO – nocaute (do inglês, *knockout*).

LaNEx - Laboratório de Neurociências Experimental

LASER - Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação (do inglês, *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*)

LEDT- Terapia por Diodo Emissor de Luz (LEDT, do inglês *Light Emitting Diode Therapy*)

LTB4 – Leucotrieno B4

Mars – Maresinas

MIA - Morte Indolor Assistida

MPO – Mieloperoxidase

NF-κB – Fator nuclear kappa B (do inglês, *Nuclear factor kappa B*)

NGF - Fator de crescimento do nervo (do inglês *Nerve growth factor*)

NHI - Instituto Nacional de Saúde dos EUA (do inglês, *National Institutes of Health*)

NO - Óxido nítrico

OA - Osteoartrite

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAMP's – Padrão molecular associado a patógeno (do inglês, *Pathogen-associated molecular pattern*)

PICs - Práticas Integrativas e Complementares

PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub> (do inglês, *Prostaglandin E<sub>2</sub>*)

PLA<sub>2</sub> – Fosfolipase A<sub>2</sub> (do inglês, *Phospholipase A<sub>2</sub>*)

PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PR<sub>3</sub> – Proteinase-3

Prots – Protectinas

R-ET<sub>A</sub> - Receptor para Endotelina A

R-ET<sub>B</sub> - Receptor para Endotelina B

ROS - Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *Reactive oxygen species*)

Rvs – Resolvinas

SNC - Sistema nervoso central

SNP - Sistema nervoso periférico

SRTX S6c - Sarafotoxina 6c

SUS - Sistema Único de Saúde

TNF - Fator de necrose tumoral (do inglês, *tumor necrosis factor*)

TRPV1 - Receptor de potencial transiente vanilóide 1 (do inglês, *transient receptor potential vanilloid 1*).

TRPV4 - Receptor de potencial transiente vanilóide 4 (do inglês, *transient receptor potential vanilloid 4*).

TTX-R Na<sup>+</sup> - Canal de sódio dependente de voltagem resistente a tetrodotoxina (do inglês, *Tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel*)

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

UNISUL - Universidade do Sul de Santa Catarina

UV - Radiação ultravioleta

VCAM-1 - Molécula de adesão celular vascular 1 (do inglês, *Vascular cell adhesion molecule*).

Lista de quadros

Quadro 1 – Variáveis de estudo .....40

## Lista de figuras

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Processo inflamatório e resolutivo .....                                                                        | 12 |
| Figura 2 - Esquema da via periférica endógena de analgesia mediada pela ativação de ET <sub>B</sub> no queratinócito ..... | 17 |
| Figura 3 - Vias de sinalização celulares desencadeadas pela FBM.....                                                       | 24 |
| Figura 4 - Profundidade de penetração de diferentes comprimentos de onda .....                                             | 25 |
| Figura 5 - Representação ilustrativa da injeção (i.pl.) de CFA 50% .....                                                   | 32 |
| Figura 6 - Imagem dos equipamentos de LEDT.....                                                                            | 33 |
| Figura 7 - Avaliação da hiperalgesia mecânica .....                                                                        | 34 |
| Figura 8 - Linha de tempo Experimental.....                                                                                | 35 |
| Figura 9 - Esquema representativo da avaliação da participação dos receptores ET <sub>B</sub> .....                        | 37 |
| Figura 10 - Esquema representativo da avaliação da participação dos receptores opioides.....                               | 38 |

## Lista de tabelas

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Tabela de dosimetria..... | 32 |
|--------------------------------------|----|

## SUMÁRIO

|              |                                                                                                                                                         |           |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b>    | <b>APRESENTAÇÃO.....</b>                                                                                                                                | <b>5</b>  |
| <b>2.</b>    | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                 | <b>6</b>  |
| 2.1          | REFERENCIAL TEÓRICO .....                                                                                                                               | 9         |
| <b>2.1.1</b> | <b>Fisiopatologia da dor inflamatória .....</b>                                                                                                         | <b>9</b>  |
| 2.1.1.1      | Dor inflamatória em modelos não clínicos .....                                                                                                          | 15        |
| <b>2.1.2</b> | <b>O papel do sistema endotelinérgico na dor .....</b>                                                                                                  | <b>16</b> |
| <b>2.1.3</b> | <b>O papel do sistema opioide na dor .....</b>                                                                                                          | <b>18</b> |
| <b>2.1.4</b> | <b>A influência do sexo no processamento da dor .....</b>                                                                                               | <b>19</b> |
| <b>2.1.5</b> | <b>Terapia por fotobiomodulação .....</b>                                                                                                               | <b>22</b> |
| <b>3.</b>    | <b>OBJETIVOS .....</b>                                                                                                                                  | <b>28</b> |
| 3.1          | OBJETIVO GERAL.....                                                                                                                                     | 28        |
| 3.2          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                                                                                             | 28        |
| <b>4.</b>    | <b>MÉTODOS .....</b>                                                                                                                                    | <b>29</b> |
| 4.1          | TIPO DE ESTUDO.....                                                                                                                                     | 29        |
| 4.2          | MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....                                                                                                                           | 29        |
| 4.3          | ANIMAIS.....                                                                                                                                            | 30        |
| <b>4.3.1</b> | <b>Cálculo amostral.....</b>                                                                                                                            | <b>31</b> |
| 4.4          | ENSAIOS, TESTES E TÉCNICAS .....                                                                                                                        | 31        |
| <b>4.4.1</b> | <b>Modelo de inflamação persistente induzida pelo CFA .....</b>                                                                                         | <b>31</b> |
| <b>4.4.2</b> | <b>Tratamento com a LEDT .....</b>                                                                                                                      | <b>32</b> |
| <b>4.4.3</b> | <b>Avaliação da hiperalgesia mecânica.....</b>                                                                                                          | <b>33</b> |
| 4.5          | DELINEAMENTO DE ESTUDO.....                                                                                                                             | 35        |
| <b>4.5.1</b> | <b>Curva dose-resposta da SRTX S6c .....</b>                                                                                                            | <b>36</b> |
| <b>4.5.2</b> | <b>Avaliação da participação dos R-ET<sub>B</sub> e receptores opioides periféricos no efeito anti-hiperalgésico induzido pela LEDT e SRTX S6c.....</b> | <b>36</b> |
| <b>4.5.3</b> | <b>Avaliação do imunoconteúdo dos R-ET<sub>B</sub> periféricos pela técnica de Western Blotting.....</b>                                                | <b>38</b> |
| 4.6          | VARIÁVEIS.....                                                                                                                                          | 40        |
| 4.7          | PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS .....                                                                                                                 | 41        |
| 4.8          | ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....                                                                                                                        | 41        |
| <b>5.</b>    | <b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>                                                                                                                          | <b>43</b> |
| <b>6.</b>    | <b>CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                                   | <b>46</b> |

|    |                                                                |    |
|----|----------------------------------------------------------------|----|
| 7. | REFERÊNCIAS.....                                               | 47 |
| 8. | ANEXO A - Pareceres de aprovação da Comissão de Ética<br>..... | 52 |

## 1. APRESENTAÇÃO

As seções **INTRODUÇÃO**, **REFERENCIAL TEÓRICO**, **MÉTODOS E REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** encontram-se no corpo dessa dissertação e representam a íntegra deste estudo. Os resultados e a discussão que fazem parte dessa dissertação estão apresentados sob a forma de **ARTIGO CIENTÍFICO**, o qual encontra-se publicado na revista Journal of Biophotonics .

O item **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **MÉTODOS** desta dissertação.



## 2. INTRODUÇÃO

Entre as patologias inflamatórias destacam-se a artrite reumatoide (AR) e a osteoartrite (OA) que estão entre as doenças musculoesqueléticas mais comuns, cujas prevalências aumentam com o envelhecimento, causando além da dor crônica<sup>1</sup>, incapacidade física<sup>1, 2</sup>. Em 2010 a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou a OA como a 11<sup>a</sup> causa de deficiência física mundial nos anos vividos evidenciando assim a carga dessa doença<sup>3</sup>.

Nesse sentido, a OMS tem incentivado a utilização das práticas integrativas e complementares (PICs) nos sistemas de saúde<sup>4</sup>, visto que os medicamentos alopáticos disponíveis para o tratamento da dor crônica de origem inflamatória, são caros, pouco efetivos e apresentam muitos efeitos colaterais podendo levar à dependência química<sup>5</sup>. Neste sentido, estudos que aprofundem o conhecimento acerca do mecanismo de ação das PICs tornam-se necessários para gerar evidências científicas que suportem a utilização segura e efetiva dessas abordagens. A nível nacional, a portaria que abrange a utilização das PICs no Sistema Único de Saúde (SUS) contempla a utilização da cromoterapia<sup>4</sup>. Recentemente, o termo fotobiomodulação (FBM) tem sido empregado para caracterizar os efeitos biológicos da aplicação de frequências de luz (cores) em organismos vivos<sup>6</sup> e a utilização da Terapia por Diodo Emissor de Luz (do inglês *Light Emitting Diode Therapy - LEDT*) tem se mostrado uma abordagem de baixo custo, efetivo no tratamento da dor inflamatória<sup>6-9</sup> e sem efeitos adversos<sup>10</sup>.

O crescente interesse pelos efeitos da *LEDT* no tratamento da dor crônica tem sido evidenciado pelo aumento significativo na quantidade de publicações científicas, por meio de experimentos controlados em estudos pré-clínicos e clínicos<sup>7, 11-14</sup>. No entanto, alguns aspectos ainda apresentam grandes divergências neste campo. A maior divergência encontrada na utilização da *LEDT* no tratamento da dor, está no aspecto relacionado a dosimetria, sendo definida como a quantidade de radiação oferecida ao tecido. Apesar das doses serem estabelecidas de acordo com a energia absorvida para cada tecido, parâmetros como tempo de irradiação e tamanho da área afetada geralmente apresentam grande variabilidade<sup>15</sup>. Além disso, no cálculo da densidade de energia ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ) geralmente é utilizada uma equação onde o valor da irradiância ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ) é multiplicado pelo tempo (s) de aplicação da

*LEDT*. Neste sentido, diferentes equipamentos com diferentes (potências) configurações estão disponíveis no mercado<sup>16</sup>. Acredita-se que esses diferentes aparelhos emitam a mesma quantidade de energia, uma vez que nos equipamentos de baixa potência são necessários tempos maiores de aplicação e nos equipamentos de alta potência um tempo menor de aplicação da *LEDT*.

No entanto, pelo fato de não haver equipamentos que permitem configurar diferentes potências com o mesmo comprimento de onda não se encontrou estudos que demonstrassem o efeito da potência na analgesia induzida pela *LEDT*. Neste contexto, ao se caracterizar o efeito de diferentes potências dos equipamentos da *LEDT* na hiperalgesia inflamatória, pode-se contribuir para a reprodução clínica dos estudos realizados com animais e para a definição de futuros protocolos clínicos mais efetivos e seguros. Dessa forma, são necessários mais estudos a fim de esclarecer o real efeito da potência na ação anti-hiperalgésica da *LEDT*.

A diferença sexual entre indivíduo é um aspecto importante relacionado ao processamento da dor crônica que tem sido extensivamente investigado. Mulheres, são menos tolerante à dor do que os homens<sup>17</sup>. Ademais, Sorge e colaboradores verificaram que na medula espinhal, roedores machos e fêmeas processam a dor por meio de células imunes inteiramente diferentes: microglia em roedores machos e células T em fêmeas<sup>18</sup>. Esses resultados justificam as políticas que estão surgindo em todo o mundo, inclusive do Instituto Nacional de Saúde dos EUA (do inglês *National Institutes of Health - NHI*), que obriga o uso de animais de ambos os sexos em pesquisas não-clínicas. Assim, o presente estudo também pretende investigar a influência do sexo dos animais sobre o efeito de diferentes potências na anti-hiperalgesia induzida pela *LEDT* em camundongos com inflamação periférica.

Muito se avançou no conhecimento acerca dos sistemas neurobiológicos envolvidos no mecanismo de ação da *LEDT* em relação a dor e inflamação<sup>7, 8</sup>. A partir de estudos em animais têm sido demonstrado que a *LEDT* reduz a hiperalgesia mecânica e térmica e que esse efeito está relacionado com a sua capacidade de diminuir as concentrações de citocinas pró-inflamatórias, PGE<sub>2</sub> prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE2) e o imunoconteúdo de ciclo-oxigenase<sub>2</sub> (COX<sub>2</sub>)<sup>19</sup>, ou por aumentar as concentrações de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 10 (IL-10)<sup>7</sup>. Outros sistemas que compõem o mecanismo analgésico da *LEDT* é o da via L-arginina/NO/cGMP, bem como os sistemas adenosinérgico (receptores A<sub>1</sub>) e canabinoide (receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>) periféricos e espinais<sup>12</sup>.

Estudos com camundongos, utilizando dois modelos experimentais distintos (dor inflamatória<sup>7, 20</sup> e dor operatória<sup>12</sup>) já demonstraram também que a analgesia do LEDT (950 nm e 830 nm) é dependente da liberação de opioides endógenos e que leucócitos infiltrados são uma das possíveis fontes desses peptídeos opioides<sup>21</sup>. No entanto, esse mecanismo ainda não foi investigado com o comprimento de onda de 630 nm, que juntamente com os supracitados compõem os comprimentos de onda mais citados na literatura científica nos últimos 15 anos; o que suporta sua utilização clínica<sup>22</sup>.

A explicação para os efeitos dos comprimentos de onda em tecidos biológicos envolve a ativação de cromóforos<sup>6</sup>, nesses comprimentos o cromóforo em questão é a citocromo C oxidase (CCO) da cadeia respiratória mitocondrial. No entanto, um estudo recente mostrou que animais nocaute (KO) para CCO e tratados com a LEDT 660 nm apresentaram efeitos de proliferação celular e aumento de trifosfato de adenosina (do inglês, *adenosine triphosphate* - ATP), mostrando que os efeitos da LEDT 660 nm não são dependentes da ativação da CCO. Dessa forma estudos que analisem novos sistemas envolvidos no mecanismo de ação da LEDT 630 nm se tornam necessários e relevantes<sup>23</sup>.

Paralelamente, uma relação do receptor endotelina B (R-ET<sub>B</sub>) com inflamação tem sido demonstrada, incluindo o seu papel na hiperalgesia induzida por capsaicina<sup>24</sup>, Adjuvante Completo de Freund (do inglês, *Complete Freund's Adjuvant* - CFA)<sup>25</sup> e dor neuropática<sup>26</sup>. Os R-ET<sub>B</sub> apresentam papel dual, onde sua ativação na periferia produz analgesia e na medula espinal causa dor<sup>26</sup>. Interessantemente, foi mostrado que a ativação de R-ET<sub>B</sub> no queratinócito promove a produção e liberação de peptídeos opioides, principalmente  $\beta$ -endorfina<sup>27</sup>.

Uma vez que já foi demonstrado que a LEDT induz a liberação de opioides<sup>7</sup>, especula-se nesse estudo que a ativação do R-ET<sub>B</sub> no queratinócito<sup>27</sup>, possa ser uma etapa anterior a liberação de opioide induzida pela LEDT. Diante do exposto, o presente estudo avaliou o efeito de diferentes potências da LEDT 630 nm na hiperalgesia mecânica em camundongos machos e fêmeas e ainda analisou eventos neurobiológicos envolvidos no mecanismo de ação da LEDT 630 nm tais como: o papel dos receptores opioides e do R-ET<sub>B</sub> expresso no queratinócito, na anti-hiperalgesia causada pela LEDT.

## 2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1.1 Fisiopatologia da dor inflamatória

Definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês *International Association Study of Pain*), a dor é “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”<sup>28</sup>. A dor pode ser classificada de acordo com o mecanismo fisiopatológico que ela contempla podendo ser de origem nociceptiva quando ocorre ativação de nociceptores, de origem nociplástica quando causa alteração no processamento central da dor ou de origem neuropática quando há lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial<sup>29</sup>. No contexto clínico, o termo hiperalgesia refere-se a uma resposta exacerbada a um estímulo que normalmente causa dor. Isso ocorre quando mediante ação de mediadores inflamatórios, que alteram o limiar de disparo do potencial de ação dos nociceptores<sup>30</sup>. Isso provoca um aumento do número de potenciais de ação gerados e consequentemente um aumento da percepção da dor<sup>30</sup>.

Atualmente milhares de pessoas são acometidas e incapacitadas pela dor crônica, que pode ter como origem um ou mais mecanismos fisiopatológicos sendo assim, uma melhor compreensão desse fenômeno em todas suas interfaces e a busca por soluções terapêuticas efetivas para amenizar os sintomas relacionados, são necessários<sup>5, 29</sup>.

A percepção dolorosa em seres humanos é complexa e abrange aspectos nem sempre passíveis de mensuração. Desse modo, estudos não clínicos onde a avaliação se limita a transmissão sensorial dolorosa denominada de nocicepção se tornam relevantes no auxílio de futuros estudos clínicos<sup>31</sup>. O processo neuronal de interpretação e percepção de estímulos nocivos ocorre em etapas distintas que são descritas como: transdução, condução, transmissão, modulação e percepção. A primeira, refere-se a conversão da energia gerada por um estímulo nocivo de origem térmica, mecânica ou química em potencial de ação pelos receptores sensoriais, sendo estes denominados nociceptores<sup>30</sup>. A condução consiste na propagação do impulso elétrico do sistema nervoso periférico (SNP) até o sistema nervoso central SNC. Ela inicia nas fibras de neurônios nociceptivos denominadas de fibras do tipo C e as fibras do tipo A $\delta$ <sup>30</sup>. A transmissão ocorre no corno posterior da medula espinal

(CPME), o qual é constituído por 6 lâminas; os neurônios nociceptivos periféricos transmitem a informação do SNP para o SNC por meio da liberação de neurotransmissores, que agem em seus receptores pós-sinápticos nos neurônios do CPME, que por sua vez se projetam para centros encefálicos superiores, especificamente para o tálamo, liberando neurotransmissores<sup>30</sup>.

A modulação da dor está relacionada aos impulsos descendentes inibitórios ou facilitadores que modulam a transmissão nociceptiva na medula espinal. E por fim, a percepção que compreende a assimilação dos sinais que chegam a estruturas superiores e são interpretados como dor<sup>30</sup>.

Antes de entendermos a fisiopatologia da dor inflamatória é importante ter em mente que as doenças inflamatórias crônicas resultam em diversas condições debilitantes que apresentam grande impacto socioeconômico e na qualidade de vida<sup>32</sup>. Essas afecções são diversificadas no que diz respeito à fisiopatologia, porém a dor torna-se um fator comum a todas elas<sup>32</sup>. Existem múltiplos fatores que contribuem para o risco, progressão e gravidade destas doenças. O aumento da expectativa de vida e do envelhecimento das populações tornam doenças musculoesqueléticas a quarta principal causa de incapacidade no mundo até o ano 2020<sup>32</sup>. A inflamação inerente a essas patologias está associada à inatividade física e uso prolongado de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), contribuindo para sua prevalência<sup>32</sup>. Além dos AINES, outra classe de medicamentos amplamente utilizada para o tratamento da dor, nas doenças de cunho inflamatório, é a dos opioides<sup>5</sup>. Estudos recentes apontam uma relação entre o uso prolongado desses medicamentos, somados à precariedade e negligência do atendimento público com uma maior taxa de morbidade e mortalidade<sup>5, 32</sup>.

O processo inflamatório é caracterizado desde a antiguidade por sinais e sintomas clássicos como: o rubor, caracterizado pela coloração avermelhada, que é resultado do aumento de volume sanguíneo no local da lesão; o edema, consequência do aumento da permeabilidade microvascular, bem como do extravasamento de líquido para o interstício; o calor, que surge devido ao aumento do fluxo sanguíneo na região, assim como pela atividade metabólica aumentada para a formação de mediadores inflamatórios; a dor, decorrente da alteração vascular periférica, bem como ativação ou sensibilização de nociceptores; e a perda da função, consequência de todos os fatores supracitados<sup>33-35</sup>.

De forma sucinta, o processo inflamatório é basicamente constituído de um infiltrado de células inflamatórias e de células residentes ativadas que geram um gradiente de mediadores pró-inflamatórios causando um efeito nos vasos aumentando o volume de água nos tecidos. Assim, a resolução desse processo tem como principal objetivo eliminar as células inflamatórias infiltradas e acabar com os gradientes de mediadores pró-inflamatórios. Essa homeostase, os organismos vivos podem alcançar naturalmente ou com ajuda de terapias externas.

Assim, após uma lesão tecidual ocorre a liberação de mediadores inflamatórios pelas células residentes, gerando o recrutamento de neutrófilos para o local, por meio de quimiotaxia. Essa migração ocorre por meio de fases distintas, descritas como: marginalização, rolamento, adesão ao endotélio e diapedese (figura 1), atingindo assim o tecido acometido<sup>36</sup>. Durante esse processo existe um aumento da expressão das moléculas de adesão Molécula de adesão celular vascular 1 (do inglês, *vascular cell adhesion molecule* -VCAM-1 e Moléculas de adesão intercelular 1,2,3 (do inglês, *intercellular adhesion molecules* - ICAM-1, 2, 3), selectinas (L, P, E) e integrinas presentes nas membranas celulares de leucócitos e do epitélio dos vasos sanguíneos<sup>36</sup>.

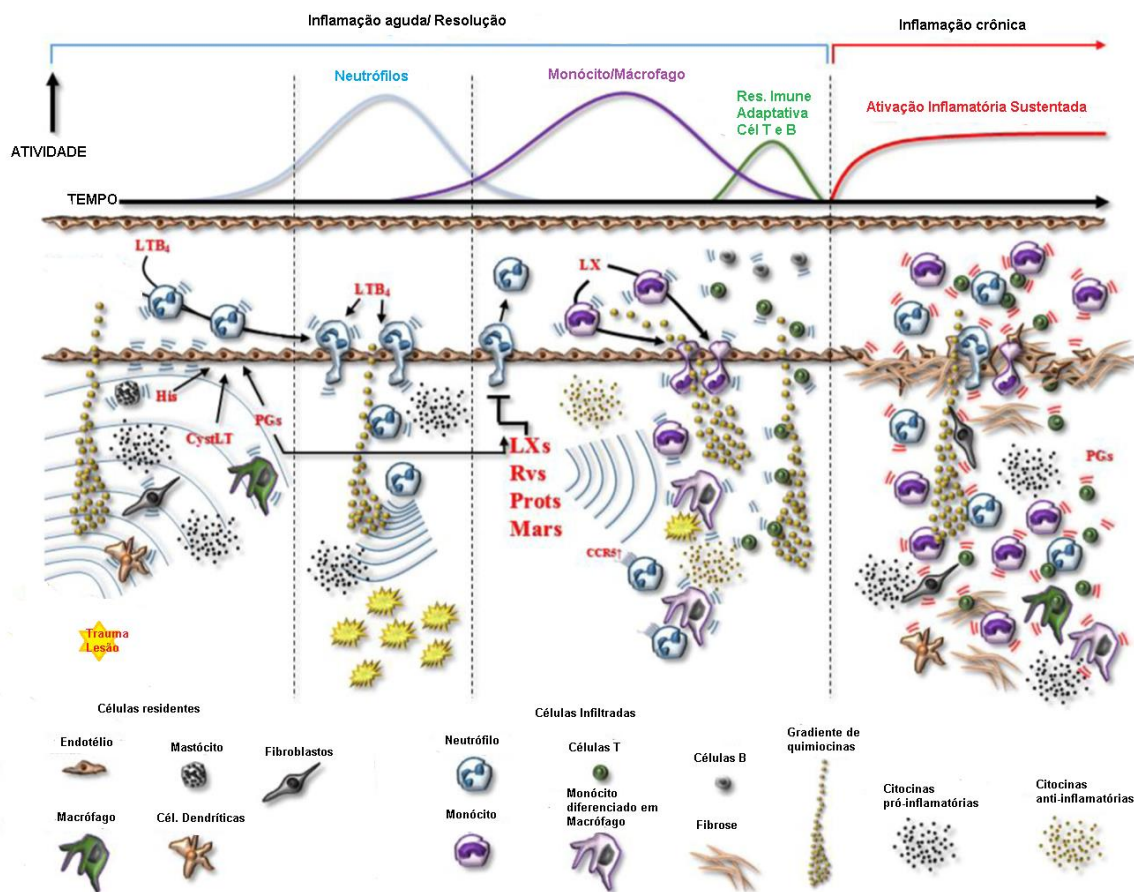


Figura 1 – Processo inflamatório e resolutivo

Legenda: A partir da lesão tecidual inicia uma cascata inflamatória que consiste em ativação de células residentes e subsequente liberação de mediadores inflamatórios que permitem a infiltração de leucócitos (neutrófilos e macrófagos). As respostas anti-inflamatórias e pró-resolutivas são caracterizadas pelo aumento da síntese de mediadores lipídicos incluindo lipoxinas (LXs), resolvinas (Rvs), protectinas (Prots) e maresinas (Mars). Estes mediadores promovem a resolução do processo inflamatório.

Fonte: Adaptado de Crean e Godson, 2015<sup>37</sup>

Em relação as células infiltradas e residentes ativadas, os neutrófilos são células que possuem grânulos citoplasmáticos que se inserem na membrana plasmática, quando ativados, liberando enzimas no meio extracelular capazes de lisar microorganismos. Essas células atuam reconhecendo padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP's por meio de seus receptores Toll likes (TLRs). Entre as enzimas liberadas podemos citar: fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), mieloperoxidase (MPO), ácido hipocloroso (HOCl), elastases, gelatinases, collagenases, metaloproteinases e proteinase<sub>3</sub> (PR<sub>3</sub>). Após a liberação destas enzimas, o neutrófilo finaliza seu ciclo entrando em processo de apoptose

(morte celular programada)<sup>38</sup>. Já os monócitos, residentes no tecido ou circulantes no sangue, quando ativados tornam-se células chamadas de macrófagos, especializadas em fagocitose de células necróticas (perfil M2).

Em relação aos gradientes de mediadores pró-inflamatórios, as prostaglandinas (PGs) são mediadores lipídicos sintetizados a partir do ácido araquidônico (AA) que são produzidas pela esterificação dos fosfolipídios de membrana pela enzima PLA<sub>2</sub>. O AA pode dar origem aos leucotrienos quando sofre ação da enzima lipoxigenase (LOX) ou as PGs (PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>), prostaciclina (PIs) e tromboxanos (TXs), quando sofre ação da enzima cicloxigenase (COX). A COX é formada de duas isoformas, a cicloxigenase<sub>1</sub> (COX<sub>1</sub>), caracterizada como constitutiva, e esta presente em quase todos os tipos de células, geralmente relacionadas com funções fisiológicas do organismo, e a COX<sub>2</sub>, chamada de indutiva, relacionada com estímulos inflamatórios, algésicos ou térmicos<sup>39</sup>. No sítio da lesão a COX<sub>2</sub> é induzida pelas citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF do inglês, *tumor necrosis factor*), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 2 (IL-2), e outros mediadores, assim como as citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10), interleucina 13 (IL-13) inibem sua expressão. Como mencionado anteriormente, a produção de gradientes de concentração desses mediadores inflamatórios é importante para promover o aumento de células infiltradas ou residentes ativadas no tecido lesionado. As PGs possuem um importante papel como mediadores pró-inflamatórios, agindo em diversos receptores específicos, aumentam a permeabilidade vascular por meio de ação sinérgica com mediadores como a histamina e a bradicinina e potencializam suas ações promovendo a estimulação e sensibilização dos nociceptores<sup>39</sup>. Além das PGs e das vias simpáticas outros mediadores como as endotelinas também são reconhecidos na gênese da dor inflamatória pela sensibilização de nociceptores<sup>24, 40</sup>.

Dentre as citocinas pró-inflamatórias, o TNF é sintetizado principalmente por macrófagos e linfócitos T após o estímulo inflamatório podendo ativar os receptores 1 e 2 para o TNF (R1TNF) (R2TNF)<sup>41</sup>. A IL-1 $\beta$  age por meio do receptor para IL-1 (IL-1R), após ligar-se, induz expressão de outras citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão em células endoteliais, sinalizando para células inflamatórias. A IL-1 $\beta$  contribui no desenvolvimento de lesão vascular através da estimulação da proliferação e diferenciação celular e a liberação de enzimas degradantes<sup>42</sup>. Já a IL-



10 é uma citocina anti-inflamatória que diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6. Com isso, desempenha um importante papel inibitório que limita e previne danos teciduais e a dor inflamatória<sup>43</sup>.

No processo inflamatório a liberação desses mediadores respeita uma hierarquia temporal de liberação e de ação o que é fundamental para a indução da hiperalgesia inflamatória<sup>40</sup>. Este aspecto fisiopatológico é de suma importância clínica, uma vez que se um passo dessa sequência for bloqueado, inibe-se o desenvolvimento de determinados eventos, sinais e sintomas do processo inflamatório, inclusive a dor<sup>40</sup>.

A hiperalgesia inflamatória é o resultado de modificações funcionais nos neurônios aferentes primários nociceptivos. Essas modificações ocorrem por meio de uma ativação metabotrópica em todo neurônio sensorial, que são mudanças metabólicas que facilitam a ativação do mesmo<sup>40</sup>. No entanto a sensibilização neuronal ocorre pela ativação de seus receptores que estimulam vias de sinalização intracelular (como a da adenosina monofosfato cíclico - AMPc - e das proteínas quinases A - PKA - e PKC), levando ao desenvolvimento da sensibilização neuronal pela alteração de características elétricas da membrana neuronal por modificar o limiar de ativação ou a densidade de vários canais iônicos, como os canais de sódio (Na<sup>+</sup>), canais de potássio (K<sup>+</sup>) e canais de cálcio (Ca<sup>2+</sup>), presentes na membrana e nas organelas citosólicas<sup>35, 40</sup>.

Entretanto, a dor periférica que se torna crônica devido a características peculiares de um processo patológico pode ocasionar a sensibilização de neurônios centrais do circuito nociceptivo e mesmo de centros associados à percepção da nocicepção, causando a amplificação do estímulo periférico. Esses eventos complementares sempre dificultam a terapêutica da dor inflamatória crônica.

De um modo geral, o processo inflamatório é caracterizado por duas fases distintas, uma fase inicial que geralmente permanece por um curto período de tempo, caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios com a finalidade de remover o tecido lesionado ou eliminar o agente agressor, durante esse processo ocorre um balanço entre a produção de mediadores pró e anti-inflamatórios, esta fase é chamada de inflamação aguda, sendo um processo auto-limitado<sup>44</sup>.

No entanto, quando o dano tecidual persiste por um período prolongado, ocorre acúmulo excessivo de neutrófilos ou processo inflamatório não apresenta

uma resolução adequada, evolui para uma fase crônica, onde ocorre depósito de colágeno e cicatrização. Muitas vezes levando a perda de função do tecido tornando-se um processo prejudicial contribuindo para a patofisiologia de muitas doenças crônicas. Na fase crônica, as células mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos) são as principais células presentes no infiltrado inflamatório<sup>44</sup>.

#### 2.1.1.1 Dor inflamatória em modelos não clínicos

Estudos experimentais envolvendo dor inflamatória geralmente utilizam compostos com potencial antigênico, tais como o CFA ou a carragenina<sup>45</sup>. O CFA é composto por óleo de parafina com mono-oleato de manitol agindo como um surfactante em suspensão, acomodando uma micobactéria (*Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium butyricum*) morta<sup>45</sup>. Enquanto que a carragenina é composta por polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marinhas<sup>45</sup>.

Os critérios para elegibilidade de um modelo não-clínico, incluem a fisiopatogênese similar a patologias humanas, facilidade de uso, reprodutibilidade de dados e duração adequada do período de teste<sup>45</sup>. Nesse sentido, no modelo de CFA quando administrado de forma subcutânea, induz aumento nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias como o TNF e IL-1 $\beta$  que por sua vez caracterizam os sinais de edema, aumento de temperatura e hiperalgesia característicos do processo inflamatório<sup>7, 46</sup>.

Além disso, no modelo de injeção intraplantar de CFA foi observado diferentes perfis de células imunológicas ao longo do tempo (6h e 96h) a partir da administração do CFA. Seis horas após a indução do modelo, ocorre um aumento significativo do número de neutrófilos (polimorfonucleares), após 96h, as células mais encontradas no tecido epitelial de ratos são monócitos e macrófagos. Ambos os grupos celulares liberam mediadores endógenos como  $\beta$ -endorfinas no local da inflamação que medeia a analgesia no processo fisiopatológico<sup>26</sup>. Além do sistema opioidérgico, a participação do sistema endotelinérgico através da ativação de seus receptores periféricos ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> na hiperalgesia mecânica e térmica de camundongos também têm sido descrita nesse modelo experimental<sup>25</sup>.

Em suma, a inflamação caracteriza-se por um processo fisiológico que envolve simultaneamente fatores vasculares, celulares e de formação de mediadores com a finalidade de recuperar a homeostase do organismo frente um a agente agressor. Dessa forma, entende-se que o modelo de CFA é capaz de reproduzir essa condição em camundongos, sendo útil em estudos de dor crônica e inflamação<sup>21, 25, 33-35, 47</sup>.

### 2.1.2 O papel do sistema endotelinérgico na dor

Os primeiros achados referentes ao sistema endotelinérgico foram descritos por Yanagisawa e Inoue e seus colaboradores, em 1988/1989 respectivamente. As endotelinas são peptídeos que produzem diversos efeitos em diferentes tecidos e sistemas e apesar dos avanços e descobertas científicas acerca desta, muito ainda há para ser esclarecido sobre o papel desempenhado pelas endotelinas nas funções fisiológicas<sup>24, 27</sup>. A família das endotelinas compreende 3 isoformas endógenas com 21 aminoácidos: ET-1: Endotelina-1, ET-2, ET-3 que ativam os receptores para ET do tipo A (R-ET<sub>A</sub>) os quais pertencem à diferentes famílias de receptores acoplados a proteínas G com diferentes afinidades. Os R-ET<sub>A</sub> se acoplam principalmente as proteínas G<sub>q/11</sub> e G<sub>q12/13</sub>, enquanto os R-ET<sub>B</sub> se acoplam as proteínas G<sub>i/o</sub> e G<sub>q/11</sub><sup>65</sup>. As isoformas ET<sub>1</sub> e ET<sub>2</sub> apresentam uma afinidade maior pelo R-ET<sub>A</sub>, do que a isoforma ET<sub>3</sub>, o efeito do R-ET<sub>A</sub> a nível vascular é produz vasoconstrição<sup>48</sup>.

Por sua vez, as três isoformas (ET1, ET2 e ET3) exibem afinidade semelhante pelo R-ET<sub>B</sub>, e quando ativado esse receptor induz vasodilatação<sup>48</sup>. Embora as células endoteliais sejam consideradas a principal fonte de ET, os genes que codificam os três peptídeos são expressos por um grande número de células. A ET-1 foi encontrada em macrófagos, leucócitos, mastócitos, neurônios, miócitos cardíacos e células vasculares da musculatura lisa onde é inibida pelo NO<sup>49</sup>.

Alguns agonistas como o composto IRL-1620 e a sarafotoxina (SRTX S6c), tem sido utilizados para ativar o R-ET<sub>B</sub>, enquanto que os antagonistas mais utilizados são o BQ-788 e o A-192621<sup>50</sup>. Esse receptor é expresso em células satélites dos gânglios sensoriais do nervo espinal (GSNE) e bainhas de células de Schwann, bem como em queratinócitos. Interessantemente, o R-ET<sub>B</sub> medeia a anti-hiperalgesia induzindo a liberação de opioides endógenos pelos queratinócitos<sup>27</sup> e possivelmente este efeito é mediado por proteínas G específicas (G<sub>s</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>3</sub>) que

aumentam o limiar de disparo do nociceptor, pela abertura de canais de  $K^+$  causando analgesia, conforme ilustrado na figura 2.

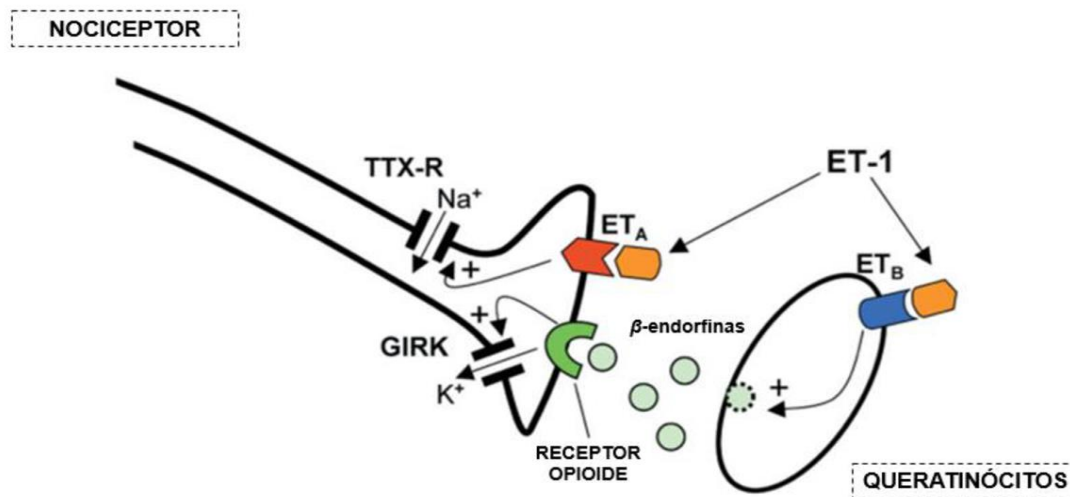


Figura 2 - Esquema da via periférica endógena da analgesia mediada pela ativação do receptor  $ET_B$  no queratinócito.

Legenda: ET-1 = endotelina-1,  $ET_A$  = receptor para endotelina A,  $ET_B$  = receptor para endotelina B, TTX-R  $Na^+$  = canal de sódio dependente de voltagem resistente a tetrodotoxina, GIRK = canais de potássio retificadores de voltagem acoplados à proteína G.

Fonte: Adaptado de Khodorova et al.<sup>27</sup>

Evidências a partir de estudos clínicos sugerem que a ET-1 esteja envolvida em vários aspectos da fisiopatologia do câncer, incluindo dor<sup>66</sup>. Já estudos não clínicos mostram que a hiperalgesia térmica e mecânica, decorrente da inflamação induzida pela injeção intraplantar de CFA em camundongos, pode ser inibida pelo antagonismo dos  $R-ET_A$  e  $R-ET_B$  periféricos<sup>50</sup>. Além disso, a ativação do  $R-ET_B$  reduziu a hiperalgesia mecânica<sup>50</sup>. Este efeito anti-hiperalgésico mostrou ser prevenido pela naloxona sugerindo a participação de peptídeos opioides como  $\beta$ -endorfina pelo queratinócito<sup>27</sup>.

Um estudo não-clínico com eletroacupuntura no modelo de dor neuropática, avaliou a participação dos receptores  $ET_B$  e observou que periféricamente a ativação do receptor  $ET_B$  produz efeito anti-hiperalgésico, no entanto quando administrado pela via intratecal (i.t), ou seja centralmente, esse efeito torna-se hiperalgésico<sup>26</sup>

Dessa forma verifica-se a necessidade de uma maior compreensão da ação do R-ET<sub>B</sub> em diferentes processos patofisiológicos, porém é relevante seu envolvimento na manutenção e sensibilização de nociceptores.

### 2.1.3 O papel do sistema opioidérgico na dor

A modulação da dor pode ocorrer em todos os níveis do sistema nervoso, sendo dependente da liberação de mediadores endógenos. O sistema opioidérgico é um dos principais sistemas envolvidos nesse processo<sup>51</sup>. Os principais receptores opioides são:  $\mu$  (mu),  $\kappa$  (kappa) e  $\delta$  (delta) que estão presentes nos terminais dos neurônios aferentes periféricos, CPME, substância cinzenta periaquedutal e hipotálamo. Os receptores  $\mu$  são responsáveis pela maior parte da analgesia induzida por opioides, mas os receptores  $\kappa$  e  $\delta$  também contribuem para a analgesia. Existem diferentes ligantes endógenos: As endorfinas derivam da clivagem da proteína precursora proopiomelanocortina e possuem afinidade para receptores  $\mu$  opioides. As encefalinas derivam da proteína precursora proencefalina e possuem afinidade pelos receptores  $\mu$  e  $\delta$  opioides. As dinorfinas, por sua vez, derivam da clivagem da prodinorfina e exibem afinidade para os receptores opioides  $\kappa$ <sup>30</sup>.

Os receptores opioides estão acoplados a proteínas G inibitórias (Gi/o) que inibem a guanilato ciclase e modulam canais iônicos. A diminuição das correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  assim como abertura canais de  $\text{K}^{+}$  retificadores são eventos importantes para a inibição da informação sensorial nociceptiva a nível periférico.

O estímulo doloroso inflamatório nos tecidos periféricos é um iniciador para a regulação de opioides em neurônios sensoriais assim como para a expressão desses receptores na periferia. Células não neuronais também são fontes desses neuropeptídeo. Células imunológicas quando estimuladas por citocinas (IL-1, IL-6 e TNF) e pelo fator de crescimento do nervo (NGF, do inglês *nerve growth factor*), provenientes do local da inflamação, são então recrutadas para os tecidos lesionados e secretam peptídeos opioides que consequentemente reduzem a dor<sup>51</sup>.

<sup>52</sup>.

Todo esse processo resulta em uma alta densidade de receptores nos terminais nervosos periféricos, que contribuem para o efeito analgésico dos opioides nos tecidos inflamados. Nos estágios iniciais inflamatórios, há envolvimento dos opioides centrais e periféricos, mas nos estágios mais tardios, a analgesia endógena

é mediada predominantemente por receptores periféricos, tornando-se, então, mais prevalente com a duração e intensidade da inflamação<sup>51, 52</sup>.

Além dos leucócitos, os queratinócitos também são capazes de liberar  $\beta$ -endorfinas por meio da ativação de ambos receptores: ET<sub>B</sub> e Cananinóide<sub>2</sub> CB<sub>2</sub>. Na periferia, a ativação dos receptores opioides aumentam o limiar de disparo dos neurônios sensoriais e atenuando a sensibilização neuronal ou a hiperexcitabilidade induzida pela inflamação<sup>30, 51</sup>.

A morfina é conhecida por ser um opioide exógeno, amplamente utilizada para fins analgésicos tanto central quanto periféricamente. Ela possui afinidade para os três receptores opioides. Sua ação analgésica pode ser antagonizada pela naloxona que age nos receptores opioides do tipo  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ , com maior afinidade pelos receptores  $\mu$ <sup>30</sup>.

Dessa forma, nota-se a importância do sistema opioide endógeno na analgesia, principalmente em casos de dor. No entanto, tornam-se necessário ainda a investigação de outros possíveis alvos terapêuticos, visto que o uso isolado de morfina e outros opioides tem apresentado tolerância e efeitos colaterais indesejáveis<sup>5, 52</sup>.

#### **2.1.4 A influência do sexo no processamento da dor**

As diferenças entre os gêneros/sexos nas experiências da dor são notáveis à muito tempo, dentro da literatura científica essa temática vem ganhando espaço, porém tratamentos analgésicos distintos para homens e mulheres ainda são pouco utilizados na clínica. Dessa forma o tema de gênero/sexo e dor tem sido um tema emergente dentro de estudos pré-clínicos e clínicos<sup>17, 53-55</sup>.

A terminologia citada nessa caracterização de gêneros e sexos também deve ser esclarecida, visto que atualmente muitas pesquisas clínicas e não-clínicas deixam de fazer esse relato de forma correta, ou apenas não descrevem essa discriminação. Neste sentido, o termo gênero se refere aos papéis sociais relacionados com a mulher e o homem, enquanto o termo sexo é uma categoria biológica inata<sup>56, 57</sup>.

Em relação a percepção e modulação da dor existe um crescente corpo de evidências apontando para uma considerável diferença entre os sexos. De forma geral essas diferenças mostram maior sensibilidade, maiores índices, e menor

tolerância à dor no sexo feminino comparados com o masculino<sup>17, 18</sup>. Uma plausível explicação para esse fato é que o papel da microglia na dor é sexualmente diferenciado. Apesar da proliferação similar da microglia no CPME em ambos os sexos serem a mesma, as fêmeas não regulam positivamente os receptores para o ATP do tipo P2X4 e usam uma via independente de microglia que medeia a hipersensibilidade à dor, as células T. Além disso, diferentemente dos machos em camundongos fêmeas, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF do inglês, *Brain-derived neurotrophic factor*) microglial não está envolvido no processamento e manutenção da dor crônica<sup>18, 53</sup>.

Entre os fatores que contribuem para esses achados as interações socioculturais e biológicas mostram que as diferenças na experiência da dor entre homens e mulheres são frequentemente atribuídas aos efeitos de gênero estereotipados, ao enfrentamento da dor e as memórias de experiências dolorosas prévias<sup>17</sup>.

Fatores como catastrofismo<sup>58</sup>, ansiedade<sup>59</sup> e depressão<sup>60</sup> frequentemente atribuídos às mulheres, também auxiliam o aumento da sensação dolorosa. Por outro lado, a empatia influencia a ativação da via descendente da dor, essa correlação foi estabelecida em um estudo clínico que mostrou que as mulheres mais empáticas a dor de um ente querido ativam mais facilmente essa via analgésica<sup>58</sup>.

Nesse sentido, experimentos em seres humanos mostram de forma bastante consistente que tratamentos analgésicos que atuam nos receptores opioides- $\mu$  apresentam diferenças quantitativas e qualitativas nos efeitos em homens e mulheres<sup>61</sup>. Essas diferenças relacionadas ao sexo não se restringem apenas as propriedades anti-hiperalgésicas dos opioides, mas também estão presentes nos efeitos colaterais induzidos por opioides, como alterações na respiração, atividade locomotora, aprendizado e memória, dependência e alterações no sistema cardiovascular<sup>61</sup>.

Em estudos não clínicos e clínicos, observa-se uma modulação dos opioides em relação ao sexo<sup>62, 63</sup>. Em um estudo com ratos fêmeas submetidas à ovariectomia e posterior reposição de testosterona, ocorreu aumento da resposta analgésica com a administração prévia de morfina sistêmica<sup>63</sup>. Já outro experimento também em ratos, a morfina mostrou uma analgesia menor em fêmeas ovariectomizadas que receberam reposição hormonal e, em machos, a castração diminuiu a resposta analgésica para o receptor opioide- $\mu$ , enquanto que a reposição

com testosterona aumentou a analgesia<sup>64</sup>. Além disso, a densidade de receptores opioides<sup>65</sup> também é influenciado pelo gênero, assim como a liberação de opioides endógenos<sup>66</sup>.

Estudos epidemiológicos mostraram a prevalência de doenças com etiologia inflamatória, como a AR, fibromialgia, síndrome do intestino irritável em mulheres que relatam mais sintomas de dor nessas doenças quando comparadas aos homens<sup>17</sup>. Nesse sentido é possível que o gênero feminino tenha maior predisposição ao desenvolvimento de processos inflamatórios, resultando diretamente em mais dor. Uma resposta imunológica para a inflamação também pode levar a sensibilização de nociceptores periféricos locais, resultando na manutenção da dor inflamatória.

Estudos não-clínicos, mostram que essas especificidades podem ser devido a genes que estão nos cromossomos sexuais, genes do cromossomo X que escapam da inativação ou genes no cromossomo Y, levando à fisiologia da dor específica de gênero<sup>17</sup>. Já um estudo com seres humanos demonstrou que o gene do receptor para melanocortina-1 (MC1R) está associado com respostas analgésicas a opioides em mulheres, mas não em homens<sup>67</sup>.

Outra diferença entre os sexos refere-se ao envolvimento do receptor do tipo TLR<sub>4</sub> na dor. As células neurogliais estão envolvidas nas vias de sinalização que produzem dor crônica, e o receptor TLR<sub>4</sub> é expresso pela micróglia no SNC<sup>68</sup>, sendo também o responsável por desencadear respostas imunológicas causada pela endotoxina lipopolissacarídeo (LPS). Estudos experimentais mostram que esse receptor não participa do processamento da dor em ratos fêmeas na medula espinal<sup>69, 70</sup>.

Há muitas evidências do sistema cardiovascular de que as ETs estão sob o controle dos hormônios sexuais e diferem entre os sexos<sup>71-73</sup>. Nesses estudos a proporção do R-ET<sub>A</sub> em veias safenas, para a expressão do R-ET<sub>B</sub> foi de 3:1 em homens idosos e 1:1 em mulheres na pós-menopausa resultando em contração dependente do sexo. Semelhante à vasculatura, o efeito nociceptivo de ET-1 depende da densidade relativa de R-ET<sub>A</sub> em nociceptores e de R-ET<sub>B</sub> nos queratinócitos (figura 2). Assim, quanto maior a resposta nociceptiva observada em ratos machos sugerem que, talvez, como na vasculatura, exista uma proporção de R-ET<sub>A</sub> maior em machos do que em fêmeas presentes na pele da pata traseira em



animais. É válido ressaltar que esse estudo leva em consideração a idade dos animais sendo essas diferenças encontradas apenas em animais jovens<sup>71</sup>.

Dessa forma a avaliação dos sistemas opioide e endotelinérgico como possíveis componentes do mecanismo analgésico de terapias voltadas para o tratamento da dor deve levar em consideração também as influências do sexo na dor de origem inflamatória.

### 2.1.5 Terapia por fotobiomodulação

Apesar de sua utilização milenar, o estudo do mecanismo fisiológico da analgesia desencadeada a partir da exposição à luz é recente, o termo fotobiomodulação (FBM) surgiu substituindo o termo “baixa intensidade” em referência aos primeiros trabalhos realizados com o uso de dispositivos LASER (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação, do inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*)<sup>74</sup>.

Por sua vez a terapia por diodo emissor de luz (LEDT, do inglês *Light Emitting Diode Therapy*) tem se mostrado similar ao LASER, apesar de suas distinções nos aspectos de aplicação de luz não coerente e divergente, enquanto o LASER apresenta características coerentes e colimadas. O aspecto coerente é definido quando as ondas dos fótons que compõem o feixe de luz estão em fase, o que ocorre na irradiação com o LASER, quando essa irradiação não se encontra em fase caracteriza a irradiação *LEDT*. A característica divergente e colimada refere-se ao aspecto das ondas do feixe de luz, no LASER esse feixe de ondas são paralelas, enquanto que no *LEDT* essas ondas de feixe de luz são desalinhadas<sup>75</sup>. A *LEDT*, além de apresentar melhor custo efetivo, sua característica de luz não coerente, não altera o papel essencial na interação luz-tecido, pois a coerência (do LASER) é perdida assim que atravessa as primeiras camadas da pele atingindo cromóforos endógenos<sup>13</sup>.

Entre as estruturas biológicas capazes de absorver luz estão os aminoácidos e ácidos nucleicos que absorvem mais significativamente o espectro ultravioleta (UV). No espectro visível, essas estruturas recebem o nome de cromóforos e são por exemplo: a hemoglobina, a melanina, além de alguns componentes da cadeia respiratória como a CCO, que além da absorção do espectro visível é capaz de absorver a irradiação infravermelha<sup>6</sup>. Além disso, as porfirinas e flavoproteínas,

também podem ser convertidas em estruturas fotossensíveis, com a geração de oxigênio molecular ( $O_2$ ), podendo desempenhar papel nos efeitos biológicos da irradiação. Recentemente a água intracelular também é considerada um cromóforo<sup>46</sup>.

O estudo do mecanismo envolvido, assim como o mapeamento desses cromóforos é bastante recente e contemplam algumas teorias como por exemplo, a ativação dos receptores transientes vanilóides 1 e 4 (TRPV<sub>1</sub> e TRPV<sub>4</sub>, do inglês, *transient receptor potential* vanilloid 1 e 4) pela radiação infravermelha absorvida pela água presente no interior da célula, desencadeando a abertura de canais iônicos<sup>74</sup>. E a ativação da CCO no interior da mitocôndria levando o aumento do metabolismo celular em consequência da fotodissociação de inibidores de NO<sup>76</sup>.

A CCO é o complexo IV da cadeia respiratória, sendo formada por duas cadeias heme (a e a<sub>3</sub>) as de sítios reativos ao cobre (Cua e Cub). Ela pode apresentar-se em diferentes configurações moleculares que facilitam a absorção de luz, tornando-a um fotorreceptor primário quando na forma intermediária (valência mista)<sup>6</sup>. Quando estimulada, a CCO provê um maior bombeamento de prótons de hidrogênio para o espaço interno mitocondrial, parte dessa energia liberada é utilizada para formar ATP e água ( $H_2O$ ) e consequentemente uma maior quantidade de elétrons transita livre pelas cadeias respiratórias da mitocôndria o que gera um aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs do inglês, *reactive oxygen species* ROS) como o ânion superóxido de oxigênio ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o NO que agem como segundos mensageiros desencadeando mudanças na transcrição gênica (figura 3)<sup>7</sup>.

As principais vias de transcrição estudadas atualmente são a do fator nuclear kappa B (NF-kB do inglês, *Nuclear factor kappa B*) e da proteína ativadora 1 (AP-1). O envolvimento dessas vias se dá pelos efeitos observados na utilização da FBM, como: Aumento da proliferação celular de fibroblastos e queratinócitos, células endoteliais e linfócitos, melhorando a neovascularização e promovendo angiogênese. Aumento também da síntese de colágeno auxiliando nos processos de cicatrização<sup>77</sup>.

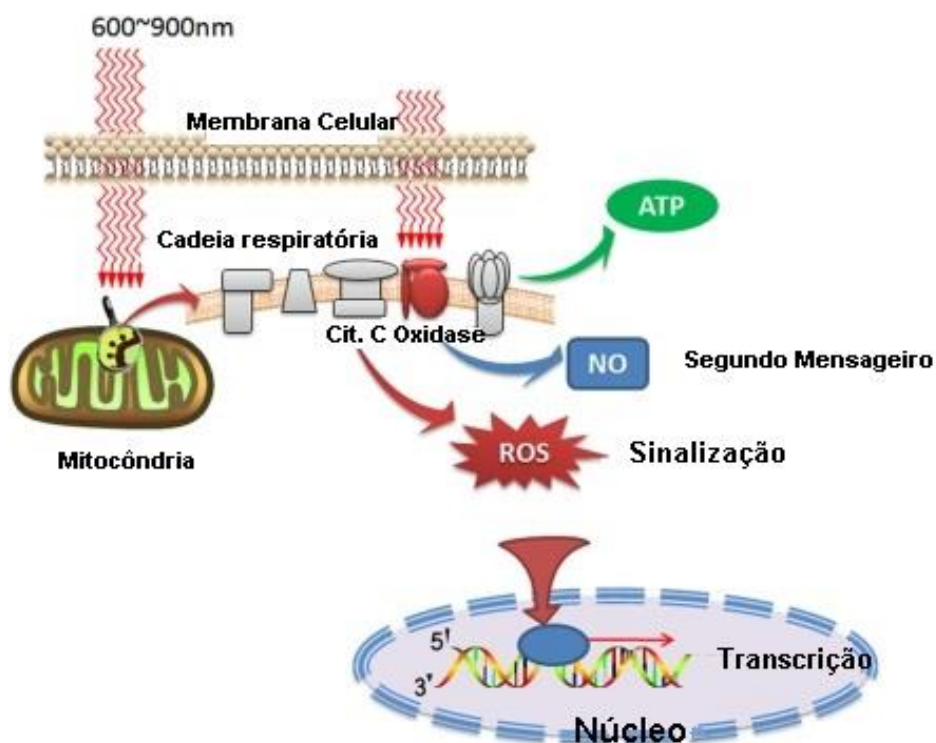


Figura 3 - Vias de sinalização celulares ativadas por FBM.

Fonte: Huang Y-Y<sup>77</sup>

Para atingir os cromóforos endógenos os parâmetros de dosimetria para a aplicação da LEDT devem ser precisos. Os principais parâmetros a serem escolhidos são o comprimento de onda ( $\lambda$ ), que consiste na distância entre dois picos do feixe de luz. Dessa forma, encontramos diferentes comprimentos de onda originados por diversas frequências de luz em nanômetros (nm) que penetram nas camadas da pele conforme ilustrado na figura 4. Essa diferenciação de nm e consequentemente na camada da pele atingida ocasiona a existência de uma “janela terapêutica” que vai de 600 nm a 1200 nm o que compreende a frequência do vermelho (luz visível) e do infravermelho (luz não-visível)<sup>78</sup>.

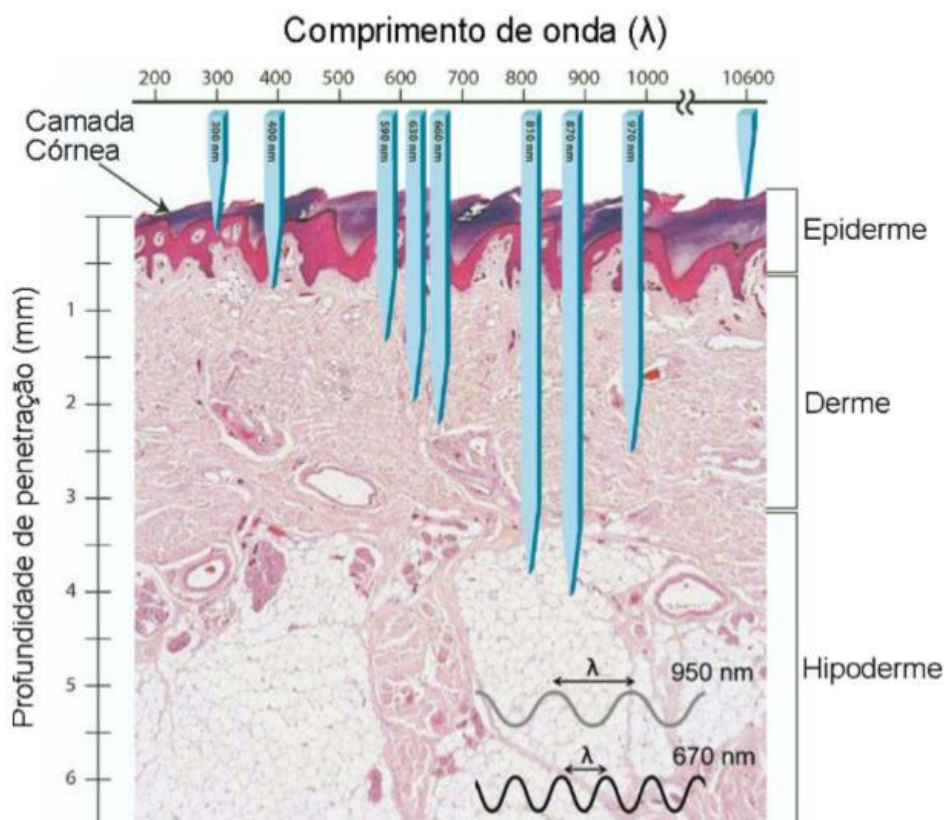


Figura 4 – Profundidade de penetração de diferentes comprimentos de onda.

Fonte: Adaptado de Barolet<sup>78</sup>

Outro parâmetro a ser observado é a fluência ( $H$ ) definida como a quantidade de energia fornecida por unidade de área sendo geralmente expressa como a dose em joules (J). A potência ( $E_e$ ) é basicamente a energia emitida pelo feixe de luz por unidade de área sendo medida em watts por centímetro quadrado ( $W/cm^2$ ). E por fim a área de aplicação do feixe luminoso descrita em  $cm^2$ <sup>20, 75</sup>.

Dentre os efeitos fisiológicos na dor produzidos pela aplicação da *LEDT* destaca-se seu potencial anti-hiperalgésico quando aplicado uma única vez com o comprimento de onda de 630 nm, 300  $mW/cm^2$  de potência e com energia total de 20,4  $J/cm^2$  imediatamente após um dano muscular produzido por exercício excêntrico. A aplicação da *LEDT* foi eficaz em atenuar a dor muscular e perda de força muscular e esse efeito teve duração por até 96 horas<sup>79</sup>. Além disso, quando aplicada em pessoas saudáveis a *LEDT* também melhorou o desempenho muscular e reduziu a fadiga associada ao exercício quando aplicada na faixa de comprimento de onda de 655 e 950 nm com potência máxima de 200  $mW/cm^2$  e com uma faixa de

dose de energia de 20 a 60 J/cm<sup>2</sup> em pequenos grupos musculares e 60 a 300 J/cm<sup>2</sup> em grandes grupos musculares<sup>80</sup>.

Outro estudo que aprofunda os aspectos neurobiológicos da *LEDT* (660 nm, 30 mW/cm<sup>2</sup>, 50J) em camundongos com inflamação na pata induzida por carragenina mostrou o envolvimento dos receptores canabinoides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, e ainda que esse efeitos anti-inflamatórios depende em parte da ativação de canais de K<sup>+</sup> ATP dependentes e da proteína quinase ativada por mitógeno p38<sup>9</sup>.

A *LEDT* 630 nm, pela profundidade alcançada pelo seu comprimento de onda, é a mais indicada para estimulação da pele (fibroblastos e queratinócitos). A sua aplicação nas células e tecidos acelera os processos celulares<sup>20,21</sup> incluindo a produção de analgesia em seres humanos<sup>79, 80</sup> e animais<sup>9</sup>.

Outro estudo clínico mostrou o efeito anti-hiperalgésico da aplicação da *LEDT* na dor pós-cirúrgica de pacientes submetidos à artroplastia total do quadril. A *LEDT* foi utilizada numa combinação de 9 pontos sendo um deles com o comprimento de onda de 905 nm, quatro diodos com o comprimento de onda de 875 nm em mais quatro de 640 nm, com a densidade de 40,3 J por ponto. Os valores da escala analógica visual, assim como os da análise das concentrações séricas de TNF e IL-8 foram menores no grupo tratado quando comparados aos valores do grupo controle<sup>8</sup>.

Além disso, em camundongos foi analisado o efeito da aplicação da *LEDT* em diferentes modelos de dor aguda e então se comparou diferentes potências (10.4 mW/cm<sup>2</sup>, 17.3 mW/cm<sup>2</sup> e 34.6 mW/cm<sup>2</sup>) com o mesmo comprimento de onda (890 nm). Porém cada potência com uma fluência distinta (12.4 J/cm<sup>2</sup>, 20.8 J/cm<sup>2</sup> e 41.6 J/cm<sup>2</sup>) respectivamente, o que inviabiliza as comparações uma vez que cada tratamento recebeu diferentes quantidades de energia<sup>81</sup>.

Para comparar diferentes potências (mW/cm<sup>2</sup>) são necessários equipamentos distintos, um estudo nacional já realizou essa comparação com equipamentos de LASER<sup>82</sup> utilizando as informações fornecidas pelos fabricantes, os autores discutiram a diversidade de estudos utilizando diferentes dosimetrias. Nenhum estudo ainda foi realizado comparando diferentes potências de *LEDT*. Esses estudos são necessários, pois os efeitos da aplicação da *LEDT* podem ser questionados devido à falta de descrição detalhada dos parâmetros utilizados, além disso, a energia final aplicada ao tecido parece ser um parâmetro importante a ser considerado<sup>82</sup>.

Nesse sentido, um estudo que compare diferentes potências dentro do mesmo comprimento de onda e dosagem contribuirá para compreensão dos efeitos anti-hiperalgésicos da *LEDT*, visto que hoje não existe nenhum consenso na literatura sobre esses parâmetros para casos de dores de cunho inflamatório<sup>82, 83</sup>. Além disso, já foi demonstrado também que a atividade anti-hiperalgésica da *LEDT* 830 e 950 nm envolve a ativação de receptores opioides periféricos e o recrutamento de leucócitos contendo opioides para o sítio inflamado<sup>7</sup>. Porém ainda não foi demonstrado por qual via esse processo é desencadeado, mas parece plausível a hipótese da ativação do R-ET<sub>B</sub> no queratinócito pela aplicação da *LEDT*, como um evento que antecede a liberação de opioides periféricos.

Com base no exposto, o presente trabalho testou duas hipóteses: i) na primeira hipótese foi testado se há influência da potência no efeito anti-hiperalgésico da *LEDT* 630 nm em camundongos machos e fêmeas; na segunda hipótese foi testado se há o envolvimento da via R-ET<sub>B</sub> (queratinócito) / receptor opioide (neurônio nociceptivo periférico) no efeito anti-hiperalgésico da *LEDT* 630 nm em camundongos machos e fêmeas<sup>27</sup>. O estudo sobre as diferenças de sexos nos casos de dor é um tema emergente dentro da comunidade científica, abordados no presente estudo de forma inédita. Além disso, a comparação de diferentes potências relacionados com o sexo e a análise dos sistemas envolvidos no mecanismo analgésico em machos e fêmeas, contribui para o avanço do conhecimento científico acerca da *LEDT*, uma terapêutica inovadora para o manejo da dor inflamatória e fortalece a utilização segura desse dispositivo que atualmente vem ganhando espaço no âmbito científico e clínico.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da potência na anti-hiperalgesia induzida pela *LEDT* 630 nm analisando o envolvimento dos sistemas endotelinérgico e opioidérgico em camundongos machos e fêmeas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em camundongos machos e fêmeas submetidos a um modelo de dor inflamatória induzida pelo CFA e tratados com a *LEDT* 630 nm:

- a) Verificar a influência de duas diferentes potências no efeito anti-hiperalgésico causada pela *LEDT*;
- b) Avaliar a participação dos R-ET<sub>B</sub> e receptores opioides periféricos na anti-hiperalgesia causada pela *LEDT*;
- c) Investigar as alterações do imunoconteúdo dos R-ET<sub>B</sub> periféricos causada pela *LEDT*.

## 4. MÉTODOS

### 4.1 TIPO DE ESTUDO

A presente pesquisa caracteriza-se como experimental de natureza quantitativa. Com caráter de pesquisa básica por meio de um modelo não clínico<sup>84</sup>.

### 4.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

As seguintes substâncias foram utilizadas: CFA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), Tween 80 adquiridos da Vetec Química Fina (RJ, BR), naloxona (Tocris Cookson Inc., EUA), anticorpo para o R-ET<sub>B</sub> (ab117529; Abcam, Cambridge, MA, EUA); Bq-788 (B157, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Sarafotoxina 6c (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); salina (LBS Laborasa Indústria Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil); isoflurano (Biochimico, Itatiaia, RJ, Brasil); actina-HRP (1:35000; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), kit de quimiluminescência (ECL; Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA), tampão de lise RIPA [composto por Nonidet P-40 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% e PBS], ortovanadato de sódio 100 mM, fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) 100 mM e coquetel de inibidores de proteases 1% (P8340 - Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA), tampão de amostra (glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%), gel de poliacrilamida e SDS (10%), membrana de PVDF (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA), anticorpo secundário com peroxidase (1:5000, cabra anti-rabbit-HRP; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA), TBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, Tween-20 0,05%) e corante vermelho (Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3%).

Juntamente com isso, foram utilizados os seguintes equipamentos: Monofilamento de *von Frey* de 0,6g da VFH (Chicago, EUA); Aparelho de LEDT gentilmente cedido por Multiple Energy Technologies (Pittsburgh, USA); Caneta MOLIMEDpen® (MDT Bioelectronics, Bettwiesen, Suíça); Fotodocumentador (Ibriht, CA, EUA), Centrífuga Refrigerada NT 815 (Nova Técnica Equipamentos



para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil), Cuba (Bio-Rad mini trans Blot@ Cell, USA); Agitador de tubos vórtex (modelo Q-220B1, Quimis, Diadema, SP, Brasil); Balança digital alta precisão eletrônica (Sf-400 1g a 10 Kg, Adrialaboratórios, PR, Brasil);

Espectrofotômetro (modelo U-2001, Hitachi, Japão); Máquina de Oxigênio (Modelo 2FN, série 0201, Narcosul, Porto Alegre, RS, Brasil).

Os experimentos foram realizados nos setores de comportamento e de Bioquímica e Biologia Molecular do laboratório de Neurociências Experimental (LaNEx) da UNISUL, localizado no Campus Universitário Grande Florianópolis, unidade Pedra Branca, Bloco I2.

#### 4.3 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos e fêmeas da linhagem *Mus musculus* com idade entre 8 e 10 semanas, pesando entre em média 38,5g as fêmeas e os machos 44,7g, obtidos do Biotério Central da UFSC, aclimatados a  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , no ciclo 12h-claro/12h-escuro (claro a partir das 7h), com acesso livre a ração e água. Os animais foram randomicamente distribuídos entre os grupos, a partir dos testes basais e aclimatizados no laboratório por pelo menos 1h antes dos testes comportamentais<sup>84</sup>.

Os experimentos foram realizados após aprovação pela comissão de Ética no Uso de Animais da UNISUL (CEUA-UNISUL), sob os protocolos: 17.038.2.07.IV. e 18.033.2.07.IV. Além disso, foi seguido o princípio dos 3R's substituição (*replacement*), redução (*reduction*) e refinamento (*refinement*). Sendo o número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos o mínimo necessário para demonstrar o efeito do tratamento recebido (item 3.4)<sup>85</sup>. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório e guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes<sup>84</sup>, assim como o guia *ARRIVE* para estudos não clínicos<sup>86</sup>.

### 4.3.1 Cálculo amostral

A previsão do número de animais foi baseada de acordo com a equação de para a determinação do tamanho de uma amostra sem reposição<sup>85</sup>. Segundo a fórmula:  $n = \{[(z \text{ alfa} + z \text{ beta}) * s] / \text{sigma}\}^2$ .

O valor de alfa foi fixado em 0,05 com o valor de z alfa baseado na tabela de valores de z para distribuição bi-caudal (two tailed) de 1,96.

O valor de beta foi fixado em 0,10, com o valor de z beta baseado na tabela de valores de z (distribuição unicaudal), que é 1,28.

O valor da diferença entre as médias dos grupos foi estabelecido pelo menos 40%. (baseado em dados experimentais do nosso laboratório). Experimentos biológicos têm embutido um erro da ordem de 10 a 15% (resultantes de variações individuais, erro no procedimento cirúrgico, erros de dosagem, etc.). Diferenças entre dois grupos que sejam menores que 20% do valor da média de cada grupo podem aumentar a probabilidade de cometer erros tipo I ou tipo II.

O valor do desvio padrão estabelecido em 35% do valor das médias, (baseado em dados experimentais do LaNEx). Portanto, ao aplicarmos os dados na fórmula, obtém-se:  $n = \{[(1,96 + 1,28) * 35] / 40\}^2 = 8,0$ . Logo, foram necessários 8 animais em cada grupo experimental. Sendo assim foi necessário para esse estudo um total de 224 camundongos machos e 224 camundongos fêmeas<sup>85</sup>.

## 4.4 ENSAIOS, TESTES E TÉCNICAS

### 4.4.1 Modelo de inflamação persistente induzida pelo CFA

Nesta pesquisa foi utilizado o modelo animal de indução de inflamação periférica por meio da administração intraplantar (i.pl., Figura 6) de CFA de uma solução concentrada a 50%, dissolvido em solução salina 0,9% e Tween®80. Cada animal recebeu 20 µl desta solução na pata traseira direita. Este procedimento produz uma robusta hiperalgesia, a qual pode ser identificada pelo aumento da resposta ao estímulo mecânico produzido com o uso do monofilamento de von Frey<sup>7</sup>,

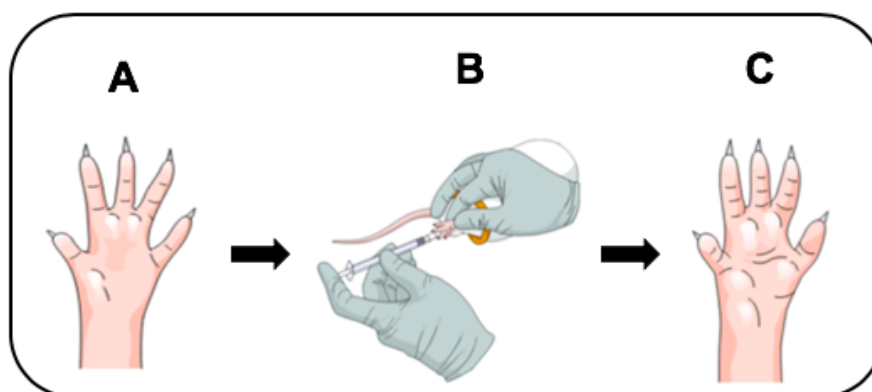


Figura 5 - Representação ilustrativa da injeção (i.pl.) de CFA 50%

Legenda: Representação da injeção de CFA na pata posterior direita do camundongo. Pata do camundongo naïve (Painel A). Injeção intraplantar (i.pl.) de 20µl de CFA 50% (Painel B). Pata do camundongo 6h após a injeção i.pl. de CFA (Painel C).

#### 4.4.2 Tratamento com a LEDT

Nesta pesquisa foram utilizados dois equipamentos de *LEDT*. Uma placa controlada por um Software desenvolvido pela Scientifica consulting LLC e gentilmente cedido para UNISUL em parceria acadêmica. E uma caneta da marca MOLIMEDpen® (MDT Bioelectronics, Bettwiesen, Suíça). Os dois equipamentos suportam diferentes configurações de comprimentos de onda, bem como 630 nm. Os equipamentos também apresentam diferentes potências (3,5 e 90 mW/cm<sup>2</sup>). Todos os parâmetros utilizados nos tratamentos dos diferentes grupos estão descritos na tabela 1. Como no cálculo da densidade de energia (J/cm<sup>2</sup>) geralmente é utilizada uma equação onde o valor da irradiância (W/cm<sup>2</sup>) é multiplicado pelo tempo (s) de aplicação da *LEDT* para que ambos grupos recebessem a mesma quantidade de energia o grupo tratado com a potência de 3,5 mW/cm<sup>2</sup> recebeu o tratamento por 11 min. Neste sentido, os animais tiveram que ser levemente sedados, sendo que os animais controle receberam a sedação pelo mesmo período de tempo. Os animais receberam a irradiação diretamente sobre a superfície plantar da pata posterior direita, local que receberam anteriormente a injeção i.pl. de CFA (Figure 6). Para a realização do tratamento o *LED* do dispositivo foi colocado em um leve contato com a pele do animal (*LEDT on*). O grupo controle recebeu o contato do LED do dispositivo desligado (*LEDT off*) nos diferentes testes propostos<sup>7</sup>.

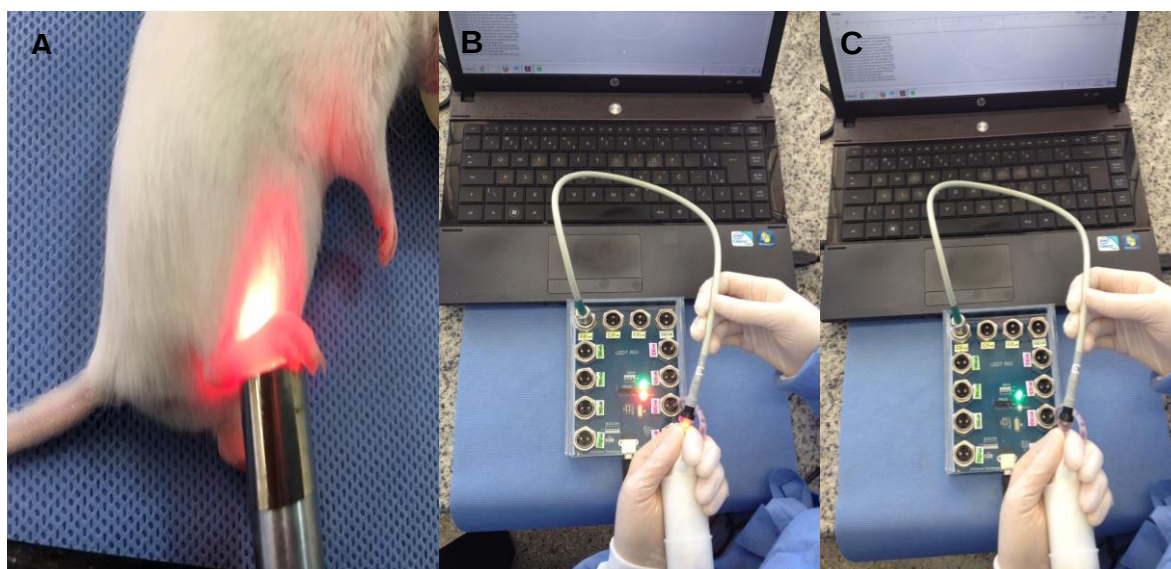


Figura 6 - Imagem dos equipamentos de LEDT

Legenda: Painel A: Tratamento com a caneta Molimed; Painel B: Tratamento com a placa de LED; Painel C: Tratamento LED off (controle).

Tabela 1 - Parâmetros de dosimetria

| Parâmetros de dosimetria |                        |                       |
|--------------------------|------------------------|-----------------------|
|                          | Caneta Molimed         | Placa LEDT            |
| Comprimento de onda      | 630 nm                 | 630 nm                |
| Potência                 | 3,5 mW/cm <sup>2</sup> | 90 mW/cm <sup>2</sup> |
| Tempo                    | 11 min                 | 0,037 min             |
| Fluência                 | 2J                     | 2J                    |
| Área de aplicação        | 1 cm <sup>2</sup>      | 1 cm <sup>2</sup>     |

#### 4.4.3 Avaliação da hiperalgesia mecânica

A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando monofilamento de von Frey, com carga de 0,6g. Para aplicação do teste, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação de acrílico (9 x 7 x 11 cm), sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre uma plataforma de tela de arame com furos. O filamento foi aplicado na pata posterior direita, atendendo a alguns critérios como: aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar, com pressão

suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total; os animais foram avaliados quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela; a resposta de retirada foi considerada quando o animal removeu totalmente a pata da tela de apoio<sup>7, 20</sup>. Os valores percentuais referentes a frequência de retirada da pata frente a 10 estimulações da pata posterior direita com o monofilamento de von Frey, foram considerados como indicativo de hiperalgesia mecânica. No dia anterior à injeção de CFA, os animais foram submetidos ao teste para caracterização da resposta basal. Apenas os animais que apresentaram uma porcentagem de resposta em torno de 20% (ou inferior) foram selecionados. As avaliações da hiperalgesia mecânica também foram realizadas em 6h e 96h<sup>21</sup> após a injeção i.pl. de CFA e em diferentes tempos após os tratamentos com a LEDT. Também foi realizada uma análise do decurso temporal do efeito anti-hiperalgésico da LEDT onde os animais foram avaliados em 0,5h, 1h e 2h após os tratamentos.

Para realização dos experimentos relacionados a avaliação da hiperalgesia mecânica camundongos machos e fêmeas foram aleatoriamente distribuídos nos seguintes grupos ( $n = 8$ )<sup>85</sup> experimentais: 1) CFA + LEDT<sub>off</sub>: Animais submetidos a injeção i.pl. de CFA, e que receberão LEDT<sub>off</sub> (dispositivo desligado); 2) CFA + LEDT<sub>on</sub>: Animais submetidos a injeção i.pl. de CFA e tratados com LEDT (3.5 mW/cm<sup>2</sup>); 3) CFA + LEDT<sub>on</sub>: Animais submetidos a injeção i.pl. de CFA e tratados com LEDT (90 mW/cm<sup>2</sup>).

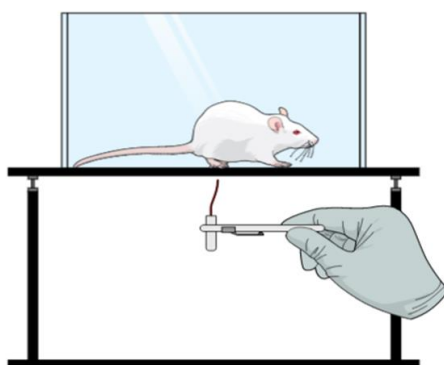


Figura 7 - Avaliação da hiperalgesia mecânica

#### 4.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Para a realização desse estudo, cinco etapas foram programadas e executadas na seguinte ordem: na etapa 1, afim de analisar o efeito anti-hiperalgésico da *LEDT* 630 nm em duas diferentes potências diferentes grupos de animais machos e fêmeas foram tratados com diferentes dispositivos de *LEDT* para determinar a melhor potência (3,5 ou 90 mW/cm<sup>2</sup>) sendo tratados e avaliados em 6h e 96h após a injeção intraplantar de CFA<sup>26</sup>. Além disso, a hiperalgesia mecânica foi avaliada até 2h após os tratamentos (Figura 8).

Na etapa 2, que teve como objetivo verificar a participação do R-ET<sub>B</sub> no efeito anti-hiperalgésico onde realizada inicialmente uma curva dose resposta com o agonista para R-ET<sub>B</sub> (SRTX S6c) para determinar a melhor dose em 6h e 96h após a injeção intraplantar de CFA em camundongos machos e fêmeas (Figura 5). Logo após as 96h desse experimento os camundongos tratados com a melhor dose anti-hiperalgésica de SRTX S6c foram submetidos ao teste de campo aberto, afim de, avaliar a atividade locomotora exploratória desses animais. Na etapa 3, a partir da determinação da dose mais efetiva da SRTX S6c em reduzir a hiperalgesia inflamatória induzida pelo CFA, se estabeleceu a dose do antagonista para o R-ET<sub>B</sub> (Bq-788) como sendo três vezes maior do que a dose do agonista para o R-ET<sub>B</sub> (SRTX S6c). Nesse sentido, foi possível nessa etapa verificar a participação do R-ET<sub>B</sub> no efeito anti-hiperalgésico da *LEDT* e da SRTX S6c, utilizada como um controle positivo da ativação do R-ET<sub>B</sub>. Para isso, outros grupos de camundongos machos e fêmeas foram analisados em 6h e 96h após a injeção intraplantar de CFA (Figura 5). A hiperalgesia mecânica foi avaliada 30 min após os tratamentos com a *LEDT* e SRTX S6c . Na etapa seguinte (etapa 4) com o objetivo de avaliar o envolvimento dos receptores opioides no efeito anti-hiperalgésico da *LEDT* e da SRTX S6c para tentar estabelecer uma relação entre ativação dos R-ET<sub>B</sub> e receptores opioides, camundongos machos e fêmeas com a inflamação da pata foram pré-tratados com naloxona (um antagonista opioide) e após 15 min, foram tratados com a *LEDT* ou SRTX S6c na pata traseira direita. A hiperalgesia mecânica também foi avaliada 30 min após os tratamentos. Na etapa 5 e última foram realizadas as coletas de amostras para a quantificação do imunoconteúdo do R-ET<sub>B</sub> na pele da pata de camundongos machos e fêmeas, 96h após a injeção intraplantar de CFA (Figura 8).

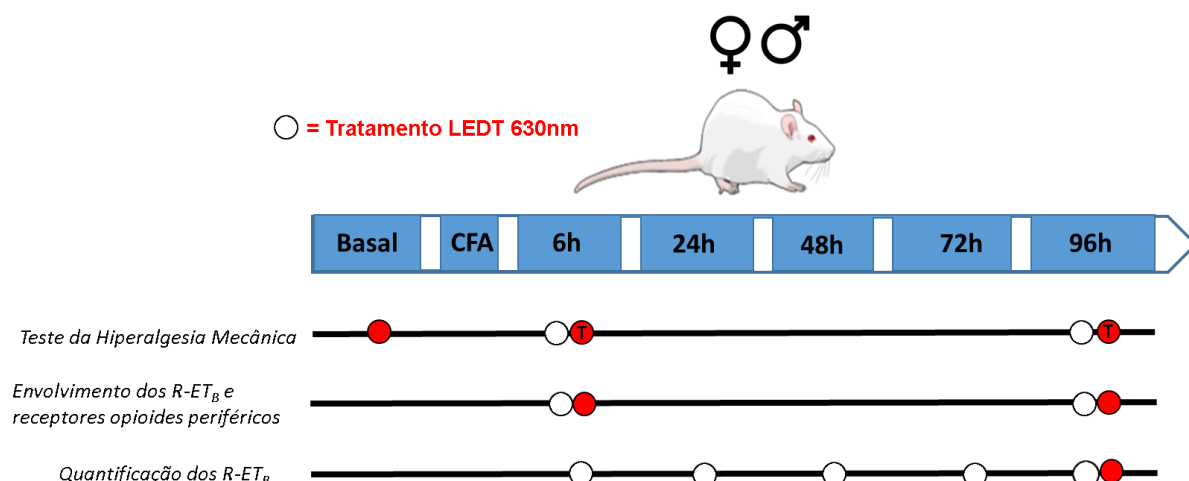


Figura 8 - Linha do tempo experimental

Legenda: *LEDT* - Terapia por Diodo Emissor de Luz; CFA - Adjuvante Completo de Freund; R-ET<sub>B</sub> – Receptor Endotelina B; T – *Time course* (avaliação até 2h após o tratamento com a *LEDT*).

#### 4.5.1 Curva dose-resposta da SRTX S6c

Para a realização da curva dose resposta do agonista do receptor ET<sub>B</sub>, no modelo de CFA na pata de camundongos machos e fêmeas, foram selecionadas com base na literatura três doses<sup>25, 26</sup>, compondo os seguintes grupos experimentais (n=8): 1) CFA+Salina 0.9% em 20µl/i.pl.2) CFA+SRTX S6c (30pmol) em 20µl/i.pl.3) CFA+SRTX S6c (90pmol) em 20µl/i.pl.4) CFA+SRTX S6c (180pmol) em 20µl/i.pl.

Os animais machos e fêmeas foram avaliados 15min após os tratamentos com a SRTX S6c através da hiperalgesia mecânica (item 3.4.3) no decurso temporal nos tempos de 6h e 96h após a indução do modelo experimental.

#### 4.5.2 Avaliação da participação dos R-ET<sub>B</sub> e receptores opioides periféricos no efeito anti-hiperalgésico induzido pela *LEDT* e SRTX S6c

Para estabelecer a dose mais efetiva da ativação do R-ET<sub>B</sub> periférico na redução da hiperalgesia mecânica, camundongos machos e fêmeas com inflamação na pata foram pré-tratados com diferentes doses de SRTX S6c (30pmol/i.pl.; 90pmol/i.pl. e 180pmol/i.pl.) ou salina 0,9% (10 µl/i.pl.). A hiperalgesia mecânica foi avaliada em 6h e 96h após a injeção i.pl. de CFA e 0,5h, 1h, 2h e 3h após os tratamentos.

Para avaliar o envolvimento do R-ET<sub>B</sub> periférico no efeito anti-hiperalgésico da *LEDT*, camundongos com inflamação na pata foram pré-tratados com Bq-788 (antagonista para o R-ET<sub>B</sub>) por via i.pl. 90pmol/20µl/i.pl. (fêmeas) ou 270pmol/20µl/i.pl. (machos) ou salina 0,9% (20µl/i.pl.). Quinze minutos após as administrações, os animais receberam tratamento com *LEDT off* ou *LEDT on*. A hiperalgesia mecânica foi avaliada trinta minutos após os tratamentos, conforme descrito no item 3.4.3.

Neste experimento foram utilizados os seguintes grupos (n=8) sendo realizados com camundongos machos e fêmeas: Grupo 1 - Salina 0,9% (20 µl/i.pl.) + *LEDT off*; Grupo 2 - Bq-788 (90pmol/20µl/i.pl. ou 270pmol/20µl/i.pl.) + *LEDT off*; Grupo 3- Salina 0,9% (20µl/i.pl.) + *LEDT on* e Grupo 4 - BQ-788 (90 pmol/20µl/i.pl. ou 270pmol/20µl/i.pl.) + *LEDT on*.

Outros grupos de animais com inflamação na pata foram pré-tratados somente com salina ou Bq-788 (90pmol/20µl/i.pl. ou 270pmol/20µl/i.pl. em fêmeas e machos respectivamente) e 15 min após receberam o tratamento com SRTX S6c (30pmol/20µl/i.pl. ou 90pmol/20µl/i.pl. em fêmeas e machos respectivamente) ou salina 0,9% (20µl/i.pl.). Trinta minutos após o tratamento foi avaliada a hiperalgesia mecânica nestes grupos. Neste experimento foram utilizados os seguintes grupos (n=8) de camundongos machos e fêmeas: Grupo 1 - Salina 0,9% (20 µl/i.pl.) + Salina 0,9% (20 µl/ i.pl.); Grupo 2 - Bq-788 (90 pmol/20µl/i.pl. ou 270 pmol/20µl/i.pl.) + Salina 0,9% (20 µl/i.pl.); Grupo 3 - Salina 0,9% (20 µl/i.pl.) + SRTX S6c (30 pmol/20µl/i.pl. ou 90 pmol/20µl/i.pl.) e Grupo 4 - Bq-788 (90 pmol/20µl/i.pl. ou 270 pmol/20µl/i.pl.) + SRTX S6c (30 pmol/20µl/i.pl. ou 90 pmol/20µl/i.pl.). Conforme ilustrado na figura 9.



Figura 9 - Esquema representativo da avaliação da participação dos receptores ET<sub>B</sub>



Para avaliar o papel dos receptores opioides na analgesia induzida pela ativação dos R-ET<sub>B</sub> e pelo tratamento com a *LEDT*, animais com inflamação na pata foram pré-tratados com uma injeção i.pl. de naloxona (5 µg/20µl/i.pl.) ou solução salina 0,9% (20 µl/i.pl) 15 min da administração de SRTX S6c (30 pmol/20µl/i.pl. ou 90 pmol/20µl/i.pl., em fêmeas e machos respectivamente) na pata traseira direita. Trinta minutos após os tratamentos foi avaliada a hiperalgesia mecânica nesses grupos (item 3.4.3). Para esse experimento foram utilizados os seguintes grupos (n=8) em camundongos machos e fêmeas: Grupo 1 - Salina (20 µl/i.pl.) + Salina (20 µl/i.pl.); Grupo Naloxona (5 µg/20µl/i.pl.) + Salina 20 µl/i.pl.); Grupo 3 - Salina (20 µl/i.pl.) + SRTX S6c (30 pmol/i.pl. ou 90 pmol/i.pl.) e Grupo 4 - Naloxona (5 µg/20µl/i.pl.) + SRTX S6c (30 pmol/i.pl. ou 90 pmol/i.pl.). Outros grupos de animais com injeção i.pl. de CFA na pata traseira direita foram tratados com salina (20 µl/i.pl) ou naloxona (5 µg/20µl/i.pl.) e *LEDT on* ou *LEDT off* na pata traseira direita. Trinta 30 minutos após os tratamentos foi avaliada a hiperalgesia mecânica nesses grupos. Nesse experimento foram utilizados os seguintes grupos (n=8) camundongos machos e fêmeas: Grupo 1 - Salina (20 µl/i.pl.) + *LEDT off*, Grupo 2 - Naloxona (5 µg/20µl/i.pl.) + *LEDT off*, Grupo 3 - Salina (20 µl/i.pl.) + *LEDT on*, Grupo 4 - Naloxona (5 µg/20µl/i.pl.) + *LEDT on*. Segue representação dos procedimentos experimentais:



Figura 10 - Esquema representativo da avaliação da participação dos receptores opioides

#### 4.5.3 Avaliação do imunoconteúdo dos R-ET<sub>B</sub> periféricos pela técnica de Western Blotting

A análise do imunoconteúdo dos R-ET<sub>B</sub> periféricos, foi realizada no tecido da pele da pata posterior direita dos camundongos. As amostras foram coletadas 96h após a injeção i.pl. de CFA e após o quarto tratamento diário com a *LEDT*. Trinta minutos após a última aplicação da *LEDT* um segmento de aproximadamente 5 mm

de tecido da pele da pata posterior direita foi removido com o auxílio de uma pinça cirúrgica. As amostras foram coletadas e armazenadas no freezer -80°C. As amostras foram processadas um mês após a retirada.

Para preparação das amostras, os tecidos congelados foram pulverizados em nitrogênio líquido e adicionado o tampão lise RIPA [composto por Nonidet P-40 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% e PBS], acrescido de ortovanadato de sódio 100 mM, fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) 100 mM e coquetel de inibidores de proteases 1% e, em seguida, incubados em gelo por 30 min.

Os homogenatos foram centrifugados a 6000 rpm por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante (correspondente ao extrato total) foi coletado, sendo uma alíquota separada para a dosagem de proteína em cada amostra, a qual foi determinada por meio do método de Bradford. Ao restante do sobrenadante, foi adicionado o tampão de amostra (glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%) na proporção de 1:6. As amostras foram fervidas (95°C; 5 min) e permaneceram armazenadas no freezer -80°C até o momento da eletroforese.

Para separação de proteínas e imunodeteção, todas as amostras foram mantidas em gelo até o completo descongelamento. Após, quantidades iguais de proteínas para cada amostra (30 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (10%). A etapa de transferência das proteínas contidas no gel para uma membrana de PVDF, foi realizada sob as seguintes condições: 90 V e 30 mA por 1 h e 30 min. Em seguida, as membranas foram coradas (vermelho de Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3%) para visualização das proteínas. Após lavagens em TBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, Tween-20 0,05%), para a retirada do excesso do corante, as membranas foram imersas em solução de TBS-T contendo BSA 5%, por 1h a temperatura ambiente, com o objetivo de bloquear as reações inespecíficas. Na sequência, as membranas foram incubadas durante 14-16 h (2-8 °C), sob agitação, com os anticorpos primários, diluídos em TBS-T contendo BSA 1%, contra as proteínas de interesse: ET<sub>B</sub> (1:5000) e β-actina-HRP (1:40000) Ao término do período de incubação, as membranas foram lavadas durante 30 minutos com TBS-T, e em seguida, incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:25000, cabra anti-rabbit-HRP; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) (exceto para anti-β-actina-HRP) por 1 h em temperatura ambiente.

Após esse período, uma nova lavagem de 30 minutos com TBS-T foi realizada seguida pela exposição das membranas durante 1 minuto ao kit de quimiluminescência e revelação através de um fotodocumentador. As análises quantitativas das bandas foram realizadas por densitometria com o auxílio do programa Image Studio Late. Os valores foram normalizados utilizando os valores obtidos para a  $\beta$ -actina, e expressos graficamente como unidades arbitrárias. Os grupos de camundongos machos e fêmeas utilizados para essa análise foram (n=8)<sup>85</sup> 1) Naive: animais não submetidos a nenhum tipo de manipulação; 2) Naive + LEDTon: Animais submetidos ao tratamento com a LEDT(90mW/cm<sup>2</sup>); 3) CFA + LEDToff: Animais submetidos a injeção i.pl. de CFA, e que receberão LEDToff (dispositivo desligado); 4) CFA + LEDTon: Animais submetidos a injeção i.pl. de CFA e tratados com LEDT(90mW/cm<sup>2</sup>).

#### 4.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 1 – Variáveis de estudo

| Variáveis                                                | Tipo         | Natureza                             | Proposta de utilização                                                    |
|----------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Sexo                                                     | Independente | Qualitativa                          | machos ou fêmeas                                                          |
| LEDT Potência (mW/ cm <sup>2</sup> )                     | Independente | Qualitativa                          | Sim ou não                                                                |
| Hiperalgesia                                             | Dependente   | Quantitativa<br>continua de<br>razão | Frequência de retirada<br>da pata em (%)<br>Média e desvio padrão         |
| Bq-788 (Antagonista<br>Endotelinérgico) (µl/i.pl.)       | Independente | Qualitativo                          | Sim ou Não                                                                |
| Naloxona (Antagonista<br>Opioide)(µl/i.pl.)              | Independente | Qualitativo                          | Sim ou Não                                                                |
| Sarafotoxina (Agonista<br>Endotelinérgico)<br>(µl/i.pl.) | Independente | Qualitativo                          | Sim ou Não                                                                |
| Densidade de R-ET <sub>B</sub>                           | Dependente   | Quantitativa<br>contínua de<br>razão | Intensidade de pixels<br>Média e desvio padrão<br>Em unidades arbitrárias |

#### 4.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Na análise estatística foi avaliada a distribuição dos dados por meio do teste de Shapiro-wilk. Desta forma, os resultados foram apresentados como média e desvio padrão da média (SD). Como os dados foram determinados como paramétricos, esses foram comparados usando análise de variância (ANOVA) de , duas vias, seguido pelo pós teste de Bonferroni para múltiplas comparações. Em todas as análises, valores de  $p$  menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Para o cálculo estatístico foi utilizado o software GraphPad Prism 7.0.

#### 4.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente projeto recebeu aprovação pela comissão de ética (CEUA-UNISUL), sob os protocolos: 17.038.207.IV. e 18.033.2.07.IV. Todos os experimentos foram conduzidos por profissionais devidamente treinados, que realizaram o curso de cuidados e manejo de animais de experimentação. Dessa forma os pesquisadores envolvidos são aptos a reconhecer sinais comportamentais, fisiológicos e clínicos que indicam dor, aflição ou estresse específicos da espécie que foi utilizada neste estudo, e capazes de ajustar os protocolos para reduzir ou remover a causa de efeitos adversos experimentais, identificar os sinais de estresse e dor desnecessários, como também realizar a eutanásia da maneira apropriada e eficaz. Estando de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório e guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes, atendendo a todos os critérios estabelecidos pelos órgãos competentes<sup>87, 88</sup>.

A Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA, 2016, assim como a legislação brasileira, estabelece a responsabilidade primária em determinar se a utilização de animais for devidamente justificada e garante a adesão aos princípios dos 3R's<sup>86, 87</sup>.

Em todas as análises os grupos controles e tratados foram avaliados paralelamente. E o princípio dos 3R's foi aplicado utilizando os mesmos animais para as análises nas 6h após a injeção i.pl de CFA e nas análises de 96h após a injeção i.pl. de CFA.

Nesse sentido para refinamento do modelo experimental, redução do sofrimento dos animais, como também manutenção do bem-estar animal, foi verificado durante todos os procedimentos experimentais os sinais de estresse e dor, adequados ao modelo animal de CFA. Quando esses sinais foram severos os animais foram imediatamente encaminhados para o médico veterinário responsável para realização da MIA. Dessa forma o número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos ocorrerão no mínimo necessário para demonstrar o efeito do tratamento recebido<sup>88</sup>.

Como sinais de exclusão avaliados nos animais para determinação de continuidade de seu uso foi utilizado: Aparecimento de crises convulsivas; inconformidades motoras; incapacidade de se mover dentro da caixa; imobilidade mesmo ao ser estimulado; incapacidade de ingerir água e alimento, mesmo tendo acesso a esses recursos; infecção sistêmica (letargia, postura encurvada, aumento da frequência respiratória); perda de peso comparado ao início do experimento; desidratação por mais de 48h; trauma por automutilação; vocalização sem ser estimulado ou vocalização ao ser estimulado e escala de faces (associado aos demais sinais clínicos)<sup>89</sup>.

Para realizar o método de mia, após os experimentos foram obedecidas as disposições da resolução número 1000 do conselho federal de medicina veterinária (cfmv), de 12 de maio de 2012, bem como da instrução normativa número 13 – diretrizes da prática de eutanásia do conselho nacional de controle de experimentação animal (CONCEA), de 20 de setembro de 2013, sendo o procedimento realizado pelo médico veterinário responsável pelo biotério experimental do Ianex, Geraldo Jorge Severgnini Bernardes, CRMV/SC 0452, por sobredose anestésica (cloridrato de xilazina 30 mg/kg associado a cloridrato de cetamina 150 mg/kg pela via intraperitoneal) seguida de aplicação de solução eutanásica t61®, por via intraperitoneal.<sup>90</sup>

## **5. ARTIGO CIENTÍFICO**

Essa sessão será apresentada com o resumo do artigo científico publicado na revista Journal of Biophotonics .

# **Keratinocytes Endothelin-B Receptors Involvement in Peripheral Opioid Analgesia Induced by Light-Emitting Diode Photobiomodulation in Male and Female Mice**

Bruna Hoffmann de Oliveira<sup>a</sup>, Rafaela Hardt da Silva<sup>a</sup>, Verônica Vargas Horewicz<sup>a,b</sup>,  
Daiana Cristina Salm<sup>a,b</sup>, Afonso S. I. Salgado<sup>a,c</sup>, Francisco José Cidral-Filho<sup>a</sup>, Anna  
Paula Piovezan<sup>a,b</sup>, Daniel F. Martins<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup>Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), University of Southern Santa  
Catarina at Palhoça, Santa Catarina, Brazil.

<sup>b</sup>Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina,  
Santa Catarina, Brazil.

<sup>c</sup>Coordinator of Integrative Physical Therapy Residency – Philadelphia University  
Center, Londrina, PR, Brazil.

\*Corresponding author: Daniel F. Martins, PT, PhD: Experimental Neuroscience  
Laboratory (LaNEx), University of Southern Santa Catarina, at Palhoça, Santa  
Catarina, Brazil and Postgraduate Program in Health Sciences, University of  
Southern Santa Catarina, at Palhoça, Santa Catarina, Brazil. Address all  
correspondence to Dr Martins at: [danielmartinsfisio@hotmail.com](mailto:danielmartinsfisio@hotmail.com) or  
[daniel.martins4@unisul.br](mailto:daniel.martins4@unisul.br). Phone: +55 (48) 3279-1144.

## Abstract

Currently LEDT is gaining space in the scientific and clinical environment. However, no study has investigated the biological effects caused by different irradiations, and the analgesic mechanism by which LEDT presents its effects remains unknown. Thus, our objective was to evaluate the effect of two different LEDT irradiances (3.5 and 90 mW/cm<sup>2</sup>) – given a 630nm wavelength and a 2 J/cm<sup>2</sup> dose – on mechanical hyperalgesia following Complete Freund's Adjuvant (CFA) intraplantar (i.pl.) injection in mice. Additionally, the role of peripheral opioid and endothelin-B receptors (ET<sub>B</sub>-R), and the sex difference was investigated. Different groups of male or female mice were evaluated 6 and 96hs after CFA. Mechanical hyperalgesia was evaluated 30min after treatments. Naloxone or Bq-788 administration, fifteen minutes before LEDT or Sarafotoxin S6c, helped determine the involvement of peripheral opioid and ET<sub>B</sub>-Rs on LEDT. Lastly, ET<sub>B</sub>-Rs skin immunocontent in both sexes was quantified after LEDT consecutive daily treatments. LEDT at an irradiance of 90mW/cm<sup>2</sup>, more effectively than 3.5mW/cm<sup>2</sup>. Bq-788 and naloxone administration prevented LEDT and SRTX S6c effects; however, LEDT did not influence peripheral ET<sub>B</sub>-Rs immunocontent. The results suggest that irradiance influences LEDT effect; and that activation of ET<sub>B</sub>-R play a role in peripheral LEDT opioid induced analgesia. Lastly, LEDT effects do not appear to be sex-dependent.

**Keywords:** Pain. Phototherapy.Receptors Endothelin. Opioid analgesia



## 6. CONCLUSÃO

Através dos achados desse estudo, pode-se concluir que:

- 1- A LEDT é eficaz na redução da anti-hiperalgesia inflamatória inicial e tardia de camundongos machos e fêmeas;
- 2- A potência da LEDT influencia seu efeito anti-hiperalgésico tanto em camundongos machos como em fêmeas;
- 3- A ativação do R-ET<sub>B</sub> desempenha um papel importante na analgesia opioide periférica induzida pela LEDT em ambos os sexos.
- 4- O efeito da LEDT, parece ser devido a sua capacidade de induzir a liberação de substâncias endógenas, visto que não houve aumento da expressão do imunocontéudo de R-ET<sub>B</sub> em camundongos machos e fêmeas.
- 5- Embora pequenas variações nas respostas tenham sido observadas entre os sexos dos camundongos parece que os efeitos da LEDT sejam independentes do sexo.

Em suma, em um modelo não-clínico de dor inflamatória a potência da LEDT 630 nm é fator crucial na obtenção dos resultados anti-hiperalgésicos observados em camundongos machos e fêmeas, e esse efeito é mediado pelo menos em parte, pelo envolvimento do R-ET<sub>B</sub> periférico (queratinócito) na analgesia opioide em ambos os sexos. Dessa forma, sugerimos uma via analgésica endógena do LEDT que, ao atingir os queratinócitos, promove a liberação de ET-1 que ativa o R-ET<sub>B</sub> liberando os opioides periféricos. Sendo assim, com esses achados referentes ao mecanismo de ação da LEDT, aumentam-se as evidências da efetividade dessa terapia em condições dolorosas inflamatórias iniciais e tardias.

Como perspectivas futuras, pretende-se aprofundar a análise do LEDT através desse mecanismo periférico de analgesia, explorando a atividade dos canais de K<sup>+</sup> ativados pelos receptores opioides liberados pela ação de ET<sub>B</sub> assim como, a ação do NO em processos de dor periférica de origem inflamatória.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Reginster JY. The prevalence and burden of arthritis. *Rheumatology* (Oxford, England). 2002;41 Supp 1:3-6.
2. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB, et al. Osteoarthritis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2:16072.
3. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* (London, England). 2012;380(9859):2163-96.
4. Brasil. Ministério da saúde. Manual de implantação de serviços de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Disponível em: [http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/publicacoes/manual\\_implantacao\\_servicos\\_pics.pdf](http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/publicacoes/manual_implantacao_servicos_pics.pdf) Acesso em: julho 2018.
5. Ballantyne JC. Opioids for the Treatment of Chronic Pain: Mistakes Made, Lessons Learned, and Future Directions. *Anesthesia & Analgesia*. 2017;125(5):1769-78.
6. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS biophysics*. 2017;4(3):337-61.
7. Martins DF, Turnes BL, Cidral-Filho FJ, Bobinski F, Rosas RF, Danielski LG, et al. Light-emitting diode therapy reduces persistent inflammatory pain: Role of interleukin 10 and antioxidant enzymes. *Neuroscience*. 2016;324:485-95.
8. Langella LG, Casalechi HL, Tomazoni SS, Johnson DS, Albertini R, Pallotta RC, et al. Photobiomodulation therapy (PBMT) on acute pain and inflammation in patients who underwent total hip arthroplasty—a randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial. *Lasers in Medical Science*. 2018;33(9):1933-40.
9. Neves LMS, Gonçalves ECD, Cavalli J, Vieira G, Laurindo LR, Simões RR, et al. Photobiomodulation Therapy Improves Acute Inflammatory Response in Mice: the Role of Cannabinoid Receptors/ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channel/p38-MAPK Signalling Pathway. *Molecular Neurobiology*. 2018;55(7):5580-93.
10. Heiskanen V, Hamblin MR. Photobiomodulation: lasers vs. light emitting diodes? *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 2018;17(8):1003-17.
11. Cidral-Filho FJ, Martins DF, Moré AOO, Mazzardo-Martins L, Silva MD, Cargnin-Ferreira E, et al. Light-emitting diode therapy induces analgesia and decreases spinal cord and sciatic nerve tumour necrosis factor- $\alpha$  levels after sciatic nerve crush in mice. *European Journal of Pain*. 2013;17(8):1193-204.
12. Cidral-Filho FJ, Mazzardo-Martins L, Martins DF, Santos ARS. Light-emitting diode therapy induces analgesia in a mouse model of postoperative pain through activation of peripheral opioid receptors and the l-arginine/nitric oxide pathway. *Lasers in Medical Science*. 2014;29(2):695-702.
13. Desmet KD, Paz DA, Corry JJ, Eells JT, Wong-Riley MTT, Henry MM, et al. Clinical and Experimental Applications of NIR-LED Photobiomodulation. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2006;24(2):121-8.
14. Leal-Junior EC, Vanin AA, Miranda EF, de Carvalho Pde T, Dal Corso S, Bjordal JM. Effect of phototherapy (low-level laser therapy and light-emitting diode therapy) on exercise performance and markers of exercise recovery: a systematic review with meta-analysis. *Lasers Med Sci*. 2015;30(2):925-39.
15. Rodrigues dOA, Aver VA, Silva TS, Foschini ME, Móes A-PG, Thiago DM, et al. Pre-Exercise Infrared Photobiomodulation Therapy (810 nm) in Skeletal Muscle Performance and Postexercise Recovery in Humans: What Is the Optimal Power Output? *Photomedicine and Laser Surgery*. 2017;35(11):595-603.

16. De Marchi T, Schmitt VM, Danubia da Silva Fabro C, da Silva LL, Sene J, Tairova O, et al. Phototherapy for Improvement of Performance and Exercise Recovery: Comparison of 3 Commercially Available Devices. *Journal of athletic training*. 2017;52(5):429-38.
17. Mogil JS. Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nature Reviews Neuroscience*. 2012;13:859.
18. Sorge RE, Mapplebeck JCS, Rosen S, Beggs S, Taves S, Alexander JK, et al. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nature Neuroscience*. 2015;18:1081.
19. Chia YY, Liu CC. The Antinociceptive Effect of Light-Emitting Diode Irradiation on Incised Wounds Is Correlated with Changes in Cyclooxygenase 2 Activity, Prostaglandin E2, and Proinflammatory Cytokines. 2017;2017:4792489.
20. Turnes BL. Efeito analgésico da terapia por diodo emissor de luz (830 e 950 nm) na dor inflamatória aguda e crônica: análise dos mecanismos de ação fotobiológicos: Universidade do Sul de Santa Catarina; 2015.
21. Rittner HL, Brack A, Machelska H, Mousa SA, Bauer M, Schäfer M, et al. Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiology*. 2001;95(2):500-8.
22. Musstaf RA, Jenkins DFL, Jha AN. Assessing the impact of low level laser therapy (LLLT) on biological systems: a review. *International Journal of Radiation Biology*. 2019:1-24.
23. Lima PLV, Pereira CV, Nissanka N, Arguello T, Gavini G, Maranduba CMdC, et al. Photobiomodulation enhancement of cell proliferation at 660 nm does not require cytochrome c oxidase. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2019;194:71-5.
24. Piovezan AP, D'Orléans-Juste P, Tonussi CR, Rae GA. Effects of endothelin-1 on capsaicin-induced nociception in mice. *European Journal of Pharmacology*. 1998;351(1):15-22.
25. Baamonde A, Lastra A, Villazon M, Bordallo J, Hidalgo A, Menendez L. Involvement of endogenous endothelins in thermal and mechanical inflammatory hyperalgesia in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2004;369(2):245-51.
26. Mazzardo-Martins L, Salm DC, Winkelmann-Duarte EC, Ferreira JK, Ludtke DD, Frech KP, et al. Electroacupuncture induces antihyperalgesic effect through endothelin-B receptor in the chronic phase of a mouse model of complex regional pain syndrome type I. 2018;470(12):1815-27.
27. Khodorova A, Navarro B, Jouaville LS, Murphy J-E, Rice FL, Mazurkiewicz JE, et al. Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. *Nature Medicine*. 2003;9:1055.
28. Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*. 2008;137(3):473-7.
29. Chimenti RL, Frey-Law LA, Sluka KA. A Mechanism-Based Approach to Physical Therapist Management of Pain. *Physical therapy*. 2018;98(5):302-14.
30. Kandel ER. Princípios da neurociências. Porto Alegre: AMGH. 2014(5).
31. Gregory NS, Harris AL, Robinson CR, Dougherty PM, Fuchs PN, Sluka KA. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2013;14(11):1255-69.
32. Loukov D, Karampatos S, Maly MR, Bowdish DME. Monocyte activation is elevated in women with knee-osteoarthritis and associated with inflammation, BMI and pain. *Osteoarthritis and cartilage*. 2018;26(2):255-63.
33. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010;140(6):771-6.
34. Libby P. Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. *Nutrition Reviews*. 2007;65(s3):S140-S6.
35. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001;413:203.
36. Yuan SY, Shen Q, Rigor RR, Wu MH. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. *Microvascular research*. 2012;83(1):82-8.
37. Crean D, Godson C. Specialised lipid mediators and their targets. *Seminars in immunology*. 2015;27(3):169-76.

38. Saffar AS, Ashdown H, Gounni AS. The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival. *Curr Drug Targets*. 2011;12(4):556-62.
39. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(5):986-1000.
40. Neto OA. *Dor: princípios e prática - Dor inflamatória*. Artemed. 2009.
41. Zhang L, Berta T, Xu Z-Z, Liu T, Park JY, Ji R-R. TNF- $\alpha$  contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2. *Pain*. 2011;152(2):419-27.
42. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovascular research*. 2008;79(3):360-76.
43. Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS. The role of the transcription factor CREB in immune function. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;185(11):6413-9.
44. Kaulmann A, Bohn T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress--implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutrition research (New York, NY)*. 2014;34(11):907-29.
45. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*. 2012;211:39-50.
46. Rosas RF, Emer AA, Batisti AP, Ludtke DD, Turnes BL, Bobinski F, et al. Far infrared-emitting ceramics decrease Freund's adjuvant-induced inflammatory hyperalgesia in mice through cytokine modulation and activation of peripheral inhibitory neuroreceptors. *Journal of Integrative Medicine*. 2018;16(6):396-403.
47. Bolon B, Stolina M, King C, Middleton S, Gasser J, Zack D, et al. Rodent preclinical models for developing novel antiarthritic molecules: comparative biology and preferred methods for evaluating efficacy. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011;2011:569068.
48. Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, et al. Endothelin. *Pharmacological reviews*. 2016;68(2):357-418.
49. Smith TP, Haymond T, Smith SN, Sweitzer SM. Evidence for the endothelin system as an emerging therapeutic target for the treatment of chronic pain. *Journal of pain research*. 2014;7:531-45.
50. Hans G, Deseure K, Robert D, De Hert S. Neurosensory changes in a human model of endothelin-1 induced pain: a behavioral study. *Neuroscience letters*. 2007;418(2):117-21.
51. Iwaszkiewicz KS, Schneider JJ, Hua S. Targeting peripheral opioid receptors to promote analgesic and anti-inflammatory actions. *Frontiers in pharmacology*. 2013;4:132.
52. Stein C, Lang LJ. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Current Opinion in Pharmacology*. 2009;9(1):3-8.
53. Rosen S, Ham B, Mogil JS. Sex differences in neuroimmunity and pain. *Journal of neuroscience research*. 2017;95(1-2):500-8.
54. Nelson LH, Lenz KM. The immune system as a novel regulator of sex differences in brain and behavioral development. *Journal of neuroscience research*. 2017;95(1-2):447-61.
55. McCarthy MM, Nugent BM, Lenz KM. Neuroimmunology and neuroepigenetics in the establishment of sex differences in the brain. *Nature reviews Neuroscience*. 2017;18(8):471-84.
56. Wexler BE. Sex and Gender Reporting in Research. *Jama*. 2017;317(9):974.
57. Gahagan J, Gray K, Whynacht A. Sex and gender matter in health research: addressing health inequities in health research reporting. *International journal for equity in health*. 2015;14:12.
58. Gougeon V, Gaumond I, Goffaux P, Potvin S, Marchand S. Triggering Descending Pain Inhibition by Observing Ourselves or a Loved-One in Pain. *The Clinical journal of pain*. 2016;32(3):238-45.
59. Keogh E, Cochrane M. Anxiety sensitivity, cognitive biases, and the experience of pain. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2002;3(4):320-9.
60. Duman RS, Aghajanian GK, Sanacora G, Krystal JH. Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nat Med*. 2016;22(3):238-49.

61. Cook CD, Barrett AC, Roach EL, Bowman JR, Picker MJ. Sex-related differences in the antinociceptive effects of opioids: importance of rat genotype, nociceptive stimulus intensity, and efficacy at the mu opioid receptor. *Psychopharmacology*. 2000;150(4):430-42.
62. Gear RW, Miaskowski C, Gordon NC, Paul SM, Heller PH, Levine JD. The kappa opioid nalbuphine produces gender- and dose-dependent analgesia and antianalgesia in patients with postoperative pain. *Pain*. 1999;83(2):339-45.
63. Cataldo G, Bernal S, Markowitz A, Ogawa S, Ragnauth A, Pfaff DW, et al. Organizational manipulation of gonadal hormones and systemic morphine analgesia in female rats: effects of adult ovariectomy and estradiol replacement. *Brain research*. 2005;1059(1):13-9.
64. Stoffel EC, Ulibarri CM, Folk JE, Rice KC, Craft RM. Gonadal hormone modulation of mu, kappa, and delta opioid antinociception in male and female rats. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2005;6(4):261-74.
65. Mogil JS, Marek P, O'Toole LA, Helms ML, Sadowski B, Liebeskind JC, et al. Mu-opiate receptor binding is up-regulated in mice selectively bred for high stress-induced analgesia. *Brain research*. 1994;653(1-2):16-22.
66. Aloisi AM, Sacerdote P, Albonetti ME, Carli G. Sex-related effects on behaviour and beta-endorphin of different intensities of formalin pain in rats. *Brain research*. 1995;699(2):242-9.
67. Mogil JS, Wilson SG, Chesler EJ, Rankin AL, Nemmani KV, Lariviere WR, et al. The melanocortin-1 receptor gene mediates female-specific mechanisms of analgesia in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(8):4867-72.
68. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8514-9.
69. Tanga FY, Natile-McMenemy N, DeLeo JA. The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(16):5856-61.
70. Sorge RE, LaCroix-Fralish ML, Tuttle AH, Sotocinal SG, Austin JS, Ritchie J, et al. Spinal cord Toll-like receptor 4 mediates inflammatory and neuropathic hypersensitivity in male but not female mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(43):15450-4.
71. Ergul A, Shoemaker K, Puett D, Tackett RL. Gender differences in the expression of endothelin receptors in human saphenous veins in vitro. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1998;285(2):511-7.
72. McKelvy AD, Mark TR, Sweitzer SM. Age- and sex-specific nociceptive response to endothelin-1. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2007;8(8):657-66.
73. Costa G, Garabito M, Jimenez-Altayo F, Onetti Y, Sabate M, Vila E, et al. Sex differences in angiotensin II responses contribute to a differential regulation of cox-mediated vascular dysfunction during aging. *Exp Gerontol*. 2016;85:71-80.
74. Hamblin MR. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochemistry and photobiology*. 2018;94(2):199-212.
75. CidraL-Filho FJ. Avaliação dos mecanismos fotobiológicos envolvidos na antinocicepção induzida pela terapia por diodo emissor de luz em camundongos: Universidade do Sul de Santa Catarina; 2013.
76. Rizzi M, Migliario M, Tonello S, Rocchetti V, Reno F. Photobiomodulation induces in vitro re-epithelialization via nitric oxide production. *Lasers Med Sci*. 2018;33(5):1003-8.
77. Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2011;9(4):602-18.
78. Barolet D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. 2008;27(4):227-38.
79. Borges LS, Cerqueira MS, dos Santos Rocha JA, Conrado LA, Machado M, Pereira R, et al. Light-emitting diode phototherapy improves muscle recovery after a damaging exercise. *Lasers Med Sci*. 2014;29(3):1139-44.

80. Vanin AA, Verhagen E, Barboza SD, Costa LOP, Leal-Junior ECP. Photobiomodulation therapy for the improvement of muscular performance and reduction of muscular fatigue associated with exercise in healthy people: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2018;33(1):181-214.
81. Pigatto GR, Coelho IS, Aquino RS, Bauermann LF, Santos ARS. 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.* 2017;54(5):3205-18.
82. Fukuda T, Malfatti C. Análise da dose do laser de baixa potência em equipamentos nacionais. *Brazilian Journal of Physical Therapy.* 2008;12:70-4.
83. Nampo FK, Cavalheri V, Dos Santos Soares F, de Paula Ramos S, Camargo EA. Low-level phototherapy to improve exercise capacity and muscle performance: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2016;31(9):1957-70.
84. Ministério da ciência, tecnologia e inovação Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Instrução Normativa número 32 de 6 de setembro de 2016. Diretrizes de Integridade e de Boas Práticas para Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. .
85. Daniel WW. Biostatistics — A Foundations for Analysis in the Health Sciences. Wiley & Sons, New York. *Biometrical Journal.* 2008;37(6):744-.
86. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthi I, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Veterinary clinical pathology.* 2012;41(1):27-31.
87. Ministério da ciência, tecnologia e inovação Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica - 1ª Edição, 1,4,6,12 (2016).
88. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *PAIN.* 1983;16(2):109-10.
89. Hawkins P, Morton DB, Burman O, Dennison N, Honess P, Jennings M, et al. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals.* 2011;45(1):1-13.
90. Ministério da ciência, tecnologia e inovação Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Instrução Normativa número 13 de 20 de setembro de 2013. Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. , (2013).

## 8. ANEXO

### ANEXO A- Pareceres de aprovação da Comissão de Ética



**Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação**  
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 28 de março de 2019  
Registro na CEUA (código): 18.033.2.07.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Daniel Fernandes Martins

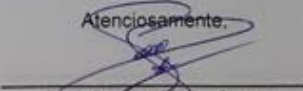
Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação da influência do sexo sobre o efeito de diferentes comprimentos de ondas e potências na anti-hiperalgesia induzida pela terapia LED em camundongos: análise do mecanismo de ação", registrada com o 18.033.2.07.IV, sob a responsabilidade de Daniel Fernandes Martins - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal 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 (CEUA) desta Instituição, em reunião de 9 de abril de 2019.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

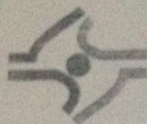
Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,

  
Prof. Sandro Melim Sgrott  
Coordenador da Comissão

UNISUL - Campus Grande Florianópolis,  
Avenida Pedra Branca, 25, Cidade Universitária, CEP 88137-270, Palhoça, SC.  
Fone: (48) 3279-1036 / E-mail: ceua@unisul.br





UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Paihoça, 14 de novembro de 2017  
Registro na CEUA (código): 17.038.2.07.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Daniel Martins

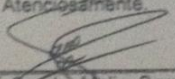
Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação do envolvimento dos receptores endotelínicos no efeito anti-hiperalgésico da fotobiomodulação", registrada com o nº17.038.2.07.IV.IV, sob a responsabilidade de Daniel Martins - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal 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 (CEUA) desta Instituição, em reunião de 14 de novembro de 2017.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal; enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,

  
Prof. Sandro Majim Sgrott  
Coordenador da Comissão

Campus Florianópolis - Unidade Pedra Branca - Avenida Pedra Branca, 25 - Cidade Universitária Pedra Branca - CEP 88137-270 - Paihoça - SC - Fone 55-48-3279-1036 - ceua@unisul.br