

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**TERAPIA DE EMISSÃO DE LUZ POR DIODO INDUZ  
ANALGESIA EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO EM  
CAMUNDONGOS: ANÁLISE DO MECANISMO DE  
AÇÃO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Glauce Regina Pigatto**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**TERAPIA DE EMISSÃO DE LUZ POR DIODO INDUZ  
ANALGESIA EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO EM  
CAMUNDONGOS: ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO**

**Glauce Regina Pigatto**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liliane de Freitas Bauermann**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Pigatto, Glauce Regina  
Terapia de emissão de luz por diodo induz analgesia em modelos de nocicepção em camundongos: análise do mecanismo de ação / Glauce Regina Pigatto.-2015.  
119 f.; 30cm

Orientadora: Liliâne de Freitas Bauermann  
Coorientador: Adair Roberto Soares dos Santos  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2015

1. LEDT 2. TRPs 3. Morfina 4. Adenosina 5. Óxido nítrico. Fibras aferentes primárias I. Bauermann, Liliâne de Freitas II. Santos, Adair Roberto Soares dos III. Título.

---

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Glauce Regina Pigatto. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: glaucepigatto.fisio@gmail.com

---

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**TERAPIA DE EMISSÃO DE LUZ POR DIODO INDUZ ANALGESIA EM  
MODELOS DE NOCICEPÇÃO EM CAMUNDONGOS: ANÁLISE DO  
MECANISMO DE AÇÃO**

elaborada por  
**Glauce Regina Pigatto**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Liliane de Freitas Bauermann, Dr<sup>a</sup>.** (UFSM)  
(Presidente/Orientadora)

  
**Adenilson de Souza da Fonseca, Dr.** (UERJ)

---

**Gustavo Orione Puntel, Dr.** (UFSM)

Santa Maria, 4 de setembro de 2015.

*Dedico esse trabalho a minha vizinha amada, (in memoriam),  
que trilhou comigo até quase o finalzinho desta caminhada  
e que sem dúvida nenhuma, faz parte dessa vitória.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Jesus, Senhor absoluto da minha vida, o qual me sustentou, capacitou e fez com que eu conquistasse essa vitória.

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

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

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

A minha orientadora, Prof. Dr. Liliane de Freitas Bauermann, pela orientação, ensinamentos, por sua amizade, companheirismo e também pelo seu cuidado comigo como uma filha.

Ao meu Co-orientador, Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, pelos seus ensinamentos, por ter confiado em mim e aberto às portas do seu laboratório.

Aos professores Alex Rafacho e Alcir Dafre, pela atenção e disponibilidade de tempo que tiveram para comigo, dois profissionais que terei sempre como exemplo.

A dois casais tão preciosos, Jonata e Ariele, os quais zelam pela minha vida e sempre foram um suporte para mim e Cláudio e Líris, os quais me adotaram em Floripa, obrigada pelo amor e cuidado de vocês, certamente vocês fazem parte dessa vitória.

Muitas pessoas passam pela nossa vida, porém, poucas deixam marcas, marcas estas que guardarei para sempre em meu coração.

Não poderia deixar de começar por aquele que sem dúvida nenhuma, esse trabalho não aconteceria, meu Co(co)-orientador, Igor Coelho, umas das pessoas mais inteligentes que eu conheci e que hoje tenho o privilégio de dizer que é meu amigo. Obrigada pelos teus ensinamentos, pelas discussões de ideias, por todo o tempo que você disponibilizou comigo, certamente não foi em vão, a vitória veio!

Róli querida, que juntamente com o Igor, me acolheu no Landi quando cheguei, obrigada pela sua amizade, pelas trocas de ideias, por toda a tua ajuda que certamente foi indispensável para que esse trabalho acontecesse.

Rosane, minha parceira “semi-cega”, outra pessoa especial na minha vida, a qual compartilhei momentos inesquecíveis. Obrigada pela tua amizade, carinho, e por toda a tua dedicação comigo. Sem você, esse trabalho não sairia.

Carol amada, que seria de mim sem você nessa reta final! Muito obrigada pela tua amizade, carinho e atenção. Certamente a tua ajuda também foi indispensável para esse trabalho acontecer.

Franzinha amada, obrigada pela sua amizade, carinho e atenção, certamente você faz parte desse trabalho. E hoje, juntamente com a Carol, além de sermos colegas de profissão, sou privilegiada de ter duas amigas tão especiais.

Minha amiga Thaís, o que dizer de você! Muitas coisas, nas últimas semanas, reta final, tive o privilegio de ficar na sua casa e compartilhar momentos incríveis com você. Obrigada por me acolher, por toda a tua ajuda e carinho. Também, sem dúvida nenhuma, você faz parte dessa vitória. Obrigada também pelos momentos divertidos no Landi, que juntamente com o Igor, fez os meus dias muito mais alegres!

Leo querido, obrigada por toda a tua ajuda nos esquemas, meu trabalho não seria o mesmo sem a destreza das tuas mãos.

Stellinha querida, obrigada pela tua amizade, pelo teu acolhimento e carinho. Certamente uma das pessoas de Floripa que valeu a pena conhecer.

Agradeço também, a Marina, Dani, Fernanda, Fernando, Ane, Welington, por todo o companheirismo, conversas, discussões de ideias e pela amizade de todos vocês.

Povo landiano, quando cheguei em Floripa, me considerava apaixonada pela pesquisa, mas depois que conheci vocês, pessoas compromissadas com aquilo que fazem e me mostraram que é possível fazer, e principalmente que não estamos sozinhos, sempre há uma equipe por trás de um trabalho, fazendo com que ele aconteça. Hoje saio de Floripa, podendo dizer que amo o que eu faço, nesse mundo apaixonante que é o mundo científico.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela oportunidade de realização deste curso.

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

Pv. 16.1



## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **TERAPIA DE EMISSÃO DE LUZ POR DIODO INDUZ ANALGESIA EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO EM CAMUNDONGOS: ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO**

AUTORA: GLAUCE REGINA PIGATTO

ORIENTADORA: DR<sup>a</sup>. LILIANE DE FREITAS BAUERMANN

CO-ORIENTADOR: DR. ADAIR ROBERTO SOARES DOS SANTOS

Data e local da defesa: Santa Maria, 4 de setembro de 2015.

A LEDT (do inglês, Light Emitting Diode Therapy) é uma categoria bastante recente da fototerapia e há evidências que acelera a cicatrização de feridas, reduz processos inflamatórios e dolorosos. No entanto, existem poucos estudos científicos sobre o mecanismo de ação da LEDT no controle da dor. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito antinociceptivo da LEDT em modelos de dor aguda, bem como investigar o possível mecanismo adjacente a este efeito em camundongos. Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss fêmeas adultos (25 a 35 g) com aproximadamente 2 meses de idade. A LEDT (890 nm, 390 mW e 20,8 J/cm<sup>2</sup>) aplicada 20 min. antes dos experimentos promoveu redução da nocicepção de origem neurogênica (1<sup>o</sup> fase) e inflamatória (2<sup>a</sup> fase) induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de formalina e do edema de pata. A LEDT também preveniu a nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético. Ademais, a LEDT preveniu a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de capsaicina [ativador de receptores de potencial transiente vanilóide-1 (TRPV1)], cinamaldeído [ativador de receptores de potencial transiente anquirina-1 (TRPA1)], mentol [ativador de receptores de potencial transiente melastatina-8 (TRPM8)], salina acidificada [ativador de canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs)] e de glutamato (ativador de receptores ionotrópicos e/ou metabotrópicos glutamatérgicos). Centralmente, a LEDT atuou aumentando a latência ao estímulo nociceptivo no modelo de placa quente. Aliado a este resultado foi demonstrado que o sistema opióide está envolvido no mecanismo de ação da LEDT, uma vez que seu efeito na dose (390 mW, 20,8 J/cm<sup>2</sup>) foi revertido pela naloxona (antagonista de receptores opióides). Foi demonstrado também o envolvimento do sistema adenosinérgico uma vez que seu efeito foi revertido pela cafeína (antagonista de receptores adenosinérgicos), DPCPX (antagonista de receptor A1) e ZM 241385 (antagonista de receptores A2A) e da via L-arginina/óxido nítrico, o qual o efeito da LEDT foi revertido pela L-arginina (um precursor do óxido nítrico) e não pela D-arginina (isômero inativo da L-arginina). Adicionalmente, a LEDT foi capaz de prevenir a nocicepção induzida pelos ativadores da via PLC/PKC e AMPc/PKA, como o PMA, BK, forskolina e a PGE2. Também foi demonstrado que o tratamento intratecal com capsaicina (para dessensibilização das fibras C), alterou a resposta nociceptiva da formalina e que a dessensibilização influenciou no efeito antinociceptivo da LEDT. Tomados em conjunto, os resultados demonstram que o efeito antinociceptivo da LEDT se deve, em parte, pelo envolvimento do sistema opióide, adenosinérgico, via L-arginina/óxido nítrico e inibição do sistema glutamatérgico, e de canais TRPA1, TRPV1, TRPM8 e ASICs, bem como da inibição da sinalização dependente da PLC/PKC e/ou AMPc/PKA. Assim, os resultados do presente estudo suportam que a LEDT possui potencial efeito no controle da dor, bem como a continuidade de estudos pré-clínicos aprofundados, e sugerem que esta terapia pode ser um complemento útil para o tratamento da dor de diferentes etiologias.

**Palavras-chave:** LEDT. TRPs. Morfina. Adenosina. Óxido nítrico. Fibras aferentes primárias.

## **ABSTRACT**

Master Dissertation  
Post-Graduating in Pharmacology  
Federal University of Santa Maria

### **LIGHT-EMITTING DIODE THERAPY INDUCES ANALGESIA IN MODELS OF OVER NOCICEPTION IN MICE: ANALYSIS OF MECHANISMS OF ACTION**

AUTHOR: GLAUCE REGINA PIGATTO

ADVISER: DR<sup>a</sup>. LILIANE DE FREITAS BAUERMANN

CO-ADVISER: DR. ADAIR ROBERTO SOARES DOS SANTOS

Date and place of defense: September 4, 2015, Santa Maria.

The LEDT is a fairly recent category of phototherapy and there is evidence that accelerates wound healing, reduce inflammation and painful. However, there are few scientific studies on the action mechanisms of LEDT in pain control. In this sense, the present study aimed to evaluate the antinociceptive effect of LEDT in models of acute pain, as well as to investigate the possible mechanism adjacent to this effect in mice. For the experiments Swiss adult female mice were used (25 to 35 g) with about 2 months old. The LEDT applied 20 minutes before the experiments (890 nm, 390 mW, 20.8 J/cm<sup>2</sup>), promoted reduction of the nociceptive neurogenic (1<sup>nd</sup> phase) and inflammatory pain (2<sup>nd</sup> phase) and paw oedema induced by intraplantar (i.pl.) injection of formalin. LEDT also prevented nociception induced by intraperitoneal injection of acetic acid. Furthermore, LEDT (20.8 J/cm<sup>2</sup>) prevented nociception induced by i.pl. injection of capsaicin [activator of transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1)], cinnamaldehyde [activator of transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1)], menthol [activator of transient receptor potential melastatin-8 (TRPM8)], acidified saline activator of acid sensitive ion channels (ASICs)] and glutamate (activator of ionotropic and/or metabotropic glutamate receptors). Centrally, LEDT increased the latency to nociceptive stimulation in the hot plate model. Moreover, the opioid system is involved in the mechanism of action of LEDT, since its was reversed by naloxone a nonselective opioid receptor antagonist). It has been demonstrated also the involvement of the adenosinergic system since its effect was reversed by caffeine (a nonselective adenosine receptor antagonist), DPCPX (A<sub>1</sub> receptor antagonist) and ZM 241385 (A<sub>2A</sub> receptor antagonist) and via L-arginine/nitric oxide, which the LEDT effect was reversed by L-arginine (a precursor of nitric oxide) and not by D-arginine (inactive isomer of L-arginine). Additionally, LEDT was able to prevent nociception induced by PLC/PKC and cAMP/PKA pathway activators, PMA, BK, forskolin and PGE<sub>2</sub>. Intrathecal treatment with capsaicin (for desensitization of C fibers) changed the nociceptive response of formalin and the desensitization of Antinociceptive effect influenced LEDT. Taken together, the results show that the antinociceptive effect of LEDT is due, in part, by involvement of the opioid system, adenosinergic, L-arginine/NO pathway and inhibition of glutamatergic system, and TRPV1, TRPA1, TRPM8 and ASICs channels, as well as the PLC/PKC and/or cAMP/PKA signaling-dependent inhibition. Thus, the results of this study support that LEDT has potential effect on pain control, and the continuity of preclinical studies and suggest that this therapy can be a useful complement to the treatment of pain of different etiologies.

**Key words:** LED. TRPs. Morphine. Adenosine. Nitric oxide. Afferent C-fibers.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Nocicepção .....	19
Figura 2 – Representação esquemática das diferenças anatômicas e funcionais das fibras sensoriais aferentes primárias.....	21
Figura 3 – Canais, receptores e mecanismos de transdução de terminações aferentes nociceptivas .....	26
Figura 4 – Principais termo-TRPs envolvidos na transmissão nociceptiva e seus principais ativadores.....	28
Figura 5 – Sistema de controle descendente da dor e sítios de ação dos opioides .....	30
Figura 6 – Fontes de adenosina nos botões sinápticos .....	32
Figura 7 – Aspectos físicos da luz irradiada por LASERs e LED.....	35
Figura 8 – LED e Junção P-N.....	36
Figura 9 – Profundidade de penetração x comprimento de onda ( $\lambda$ ).....	37
Figura 10 – Papel do óxido nítrico na fototerapia .....	42
Figura 11 – Envolvimento do sistema opioide no efeito antinociceptivo da LEDT .....	88
Figura 12 – Envolvimento do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo da LEDT ..	89
Figura 13 – Envolvimento dos receptores A1 e A2A no efeito antinociceptivo da LEDT.....	90
Figura 14 – Envolvimento dos receptores A1 e A2A no efeito antinociceptivo da LED .....	90
Figura 15 – Envolvimento da via L-arginina/óxido nítrico no efeito antinociceptivo da LEDT.....	91
Figura 16 – Representação esquemática dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo da LED.....	100

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	- Adenilato ciclase
ADP	- Difosfato de adenosina
AMPc	- Monofosfato de adenosina cíclico
ASIC	- Canal iônico sensível a ácido
ATP	- Adenosina trifosfato
BK	- Bradicinina
Cav	- Canal de cálcio controlado por voltagem
CDME	- Corno dorsal da medula espinal
CEUA	- Comissão de Ética no uso de Animais
CFA	- Adjuvante completo de Freund
CGRP	- Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DMSO	- Dimetil sulfoxido
DOL	- Boletim dor on line
DRG	- Gânglio da raiz dorsal
EP	- Receptor prostanóide E
ERK	- Cinase regulada por sinal extracelular
ERRO	- Espécies reativas de oxigênio
FSK	- Forscolina
GABA	- Ácido gama amino-butírico
GCPRs	- Receptores acoplados à proteína G
GMPC	- Guanosina monofosfato cíclica
GRD	- Gânglio da raiz dorsal
HCN	- Canais de cátions controlados por nucleotídeos cíclicos ativados por hiperpolarização
i.p.	- Via intra-peritoneal
i.pl.	- Via intra-plantar
IASP	- Associação internacional para o estudo da dor
IL-1	- Interleucina 1
IL-1 $\beta$	- Interleucina 1 $\beta$
IL-6	- Interleucina 6
J	- Joule
Kv	- Canais de potássio controlados por voltagem
LASER	- Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação
LEDT	- Terapia por Diodo Emissor de Luz
LLLT	- Low Level Laser Therapy
L-NOARG	- N $\omega$ -nitro-L-arginina
MAPK	- Proteínas cinases ativadas por mitógenos
mW/cm <sup>2</sup>	- Microwatts por centímetro quadrado
NASA	- Agência Nacional Aeroespacial
Nav	- Canal de sódio controlado por voltagem de subunidade alfa
NCHS	- National Center for Health Statistics

NF- $\kappa$ B	- Fator nuclear kappa B
NGF	- Fator de crescimento neural
NO	- Óxido nítrico
OMS	- Organização mundial da saúde
P2X	- Receptor purinérgico ionotrópico
P2Y	- Receptor purinérgico acoplado a proteína G
PAF	- Fator ativador plaquetário
PAG	- Substância cinzenta periaquedutal
PG	- Prostaglandina
PGE <sub>2</sub>	- Prostaglandina E2
PGI <sub>2</sub>	- Prostaciclina
pH	- Potencial hidrogeniônico
PKA	- Proteína cinase A
PKC	- Proteína cinase C
PLC	- Fosfolipase C
PMA	- Puristato acetato de forbol
rACC	- córtex cingulado anterior rostral
RS	- Rio Grande do Sul
RVM	- Bulbo ventromedial rostral
s.c.	- Via subcutânea
SARA	- Sistema ativador reticular ascendente
SCPV	- Substância cinzenta periaquedutal ventral
SNC	- Sistema nervoso central
SNP	- Sistema nervoso periférico
SP	- Substância P
TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral alfa
TrK	- Receptores de tirosina cinase
TRP	- Receptor de potencial transitório
TRPA	- Receptor de potencial transitório da subfamília anquirina
TRPA1	- Receptor de potencial transitório da subfamília anquirina, membro 1
TRPC	- Receptor de potencial transitório da subfamília canônico
TRPM	- Receptor de potencial transitório da subfamília melastatina
TRPM8	- Receptor de Potencial Transitório relacionado a Melastatina 8
TRPML	- Receptor de potencial transitório da subfamília mucolipina
TRPP	- Receptor de potencial transitório da subfamília polistina
TRPV	- Receptor de potencial transitório da subfamília vanilóide
TRPV1	- Receptor de potencial transitório da subfamília vanilóides, membro 1
TRPV2	- Receptor de potencial transitório da subfamília vanilóides, membro 2
TRPV3	- Receptor de potencial transitório da subfamília vanilóides, membro 3
TRPV4	- Receptor de potencial transitório da subfamília vanilóides, membro 4
VGICs	- Canais iônicos controlados por voltagem

## **LISTA DE ANEXO**

Anexo A – Carta de aprovação CEUA-UFSC .....	118
--	-----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Dor – Considerações gerais</b> .....	<b>16</b>
2.1.1	Classificação da dor .....	17
2.1.2	Dor aguda.....	17
2.1.3	Fisiopatologia da dor.....	18
2.1.3.1	Nociceptores .....	18
2.1.3.2	Canais iônicos .....	20
2.1.3.3	Fibras nociceptivas.....	20
2.1.3.3.1	Vias da transmissão nociceptiva .....	21
2.1.4	Percepção e processamento da dor.....	23
<b>2.2</b>	<b>Mediadores inflamatórios e nocicepção</b> .....	<b>23</b>
2.2.1	Sensibilização periférica .....	24
<b>2.3</b>	<b>O papel dos receptores de potencial transitório – TRPs</b> .....	<b>27</b>
<b>2.4</b>	<b>Controle da dor: Vias descendentes analgésicas</b> .....	<b>28</b>
2.4.1	Sistema Opioide .....	29
2.4.2	Sistema Adenosinérgico.....	31
<b>2.5</b>	<b>Óxido Nítrico</b> .....	<b>33</b>
<b>2.6</b>	<b>Fototerapia</b> .....	<b>34</b>
2.6.1	Terapia por diodo emissor de luz (LEDT) .....	35
2.6.2	Parâmetros utilizados na Fototerapia .....	38
2.6.3	Mecanismo de ação da fototerapia.....	39
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>44</b>
<b>4.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>DADOS ADICIONAIS</b> .....	<b>85</b>
<b>6.1</b>	<b>Materiais e métodos</b> .....	<b>85</b>
<b>6.2</b>	<b>Drogas e Reagentes</b> .....	<b>85</b>
<b>6.3</b>	<b>Envolvimento Opioidérgico</b> .....	<b>85</b>
<b>6.4</b>	<b>Envolvimento do Sistema Adenosinérgico</b> .....	<b>85</b>
6.4.1	Envolvimento do receptor A1 .....	86
6.4.2	Envolvimento do receptor A2A .....	86
<b>6.5</b>	<b>Envolvimento da Via L-arginina/óxido nítrico</b> .....	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>88</b>
<b>7.1</b>	<b>Envolvimento opioidérgico</b> .....	<b>88</b>
<b>7.2</b>	<b>Envolvimento do sistema Adenosinérgico</b> .....	<b>89</b>
<b>7.3</b>	<b>Envolvimento da via L-arginina/óxido nítrico</b> .....	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>101</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>102</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>117</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Há décadas, o gerenciamento da dor aguda tem sido debatido na literatura. Atualmente, o emprego de estratégias analgésicas visa não somente o aprimoramento de escores numéricos nas avaliações clínicas cotidianas, sendo fundamentada em outros aspectos como a rápida recuperação da funcionalidade do paciente e prevenção das consequências adversas da dor aguda, dentre elas a persistência do quadro algico o que caracteriza o estado debilitante de dor crônica (MACINTYRE; SCHUG, 2009).

Mesmo sabendo que a dor aguda apresenta propósito biológico útil, servindo como mecanismo de alerta frente a um estímulo nocivo (ONOFRE et al., 2009) a ativação de nociceptores desencadeia uma ampla resposta patofisiológica, resultando em processo inflamatório local, seguido por mudanças comportamentais (GRICHNIK, 1991; WU; RAJA, 2011). Para interrupção dos sinais nociceptivos, vários estudos pré-clínicos têm sido conduzidos para esclarecer o mecanismo biológico envolvido na transmissão do sinal doloroso. Neste contexto, canais iônicos expressos nas fibras aferentes primárias como TRP e ASIC (BASBAUM, 2009), bem como a modulação das via descendentes da dor (MILLAN, 2000) tem sido alvo de pesquisas para novas abordagens terapêuticas de ação analgésica.

Mundialmente, o emprego de agentes farmacológicos é a principal conduta para o tratamento da dor aguda (MOORE, 2009). Contudo há um crescente interesse em estudos com terapias coadjuvantes não invasivas como os fotobioestimuladores, incluindo o LASER (do inglês, Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) e LED (do inglês, Light Emitting Diode), que utilizam a luz de baixa intensidade no espectro vermelho e infravermelho para a redução do quadro algico (ENWEMEKA, 2005).

Os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos analgésicos induzidos pela LEDT relacionam-se com o metabolismo de substâncias endógenas como endorfinas, óxido nítrico, prostaglandinas, bradicinina, acetilcolina e serotonina que modulam a atividade das fibras aferentes primárias, condutoras da informação nociceptiva (REDDY, 2004; VINCK et al., 2006). Contudo ainda há poucos estudos que reproduzem estes achados em diferentes modelos experimentais de dor nociceptiva, o que torna o emprego da LEDT frágil. Portanto, a compreensão das respostas celulares fotobiológicas induzidas pela LEDT necessita ser discutida à luz dos avanços na ciência básica, para o esclarecimento ou descoberta de mecanismos responsáveis pela efetividade do tratamento.



## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Dor – Considerações gerais**

Desde os primórdios da civilização, de acordo com registros da Pré-história, e posteriormente com vários documentos escritos, a dor foi, e continua sendo, uma das grandes preocupações da humanidade. O ser humano procura esclarecer as razões que justificam a sua ocorrência, bem como, desenvolver tratamentos destinados ao seu controle (TEIXEIRA; OKADA, 2009).

Segundo a IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor), a dor pode ser definida como sendo “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos que sugerem tal dano” (LOESER; TREEDE, 2008). Logo, a dor é um sinal vital importante para a detecção e diagnóstico de inúmeras doenças, bem como para induzir um comportamento de precaução e, conseqüentemente, limitação de danos (MILLAN, 1999; WOOLF, 2000; ALMEIDA et al., 2004). Portanto, ela tem papel fisiológico relevante, funcionando como um mecanismo de alerta frente a qualquer ameaça a integridade do organismo (CHAPMAN; GAVRIN, 1999).

Contudo, é factível que a exacerbação do quadro algico reduz drasticamente a qualidade de vida do indivíduo e a persistência dos sintomas podem causar reações emocionais negativas tornando-se debilitante e causadora de sofrimento (GRIFFIS et al., 2006). Assim, a dor contempla um componente emocional relacionado à origem do caráter desagradável da dor, bem como um componente sensorial denominado nocicepção, o qual se relaciona ao processamento e codificação de estímulos nocivos (LOESER; TREEDE, 2008).

Sabendo que a sensação dolorosa é influenciada por fatores psicológicos e fisiológicos, torna-se necessário a seleção adequada de instrumentos de avaliação da dor. Em humanos, ambos componentes emocionais e nociceptivos são passíveis de mensuração através do uso de questionário e índices. Contudo, em roedores a barreira de comunicação acaba limitando avaliação da dor apenas ao componente sensorial, isto é, desconsiderando os aspectos psicológicos que influenciam na percepção final da dor. Porém, nos últimos anos novas escalas comportamentais têm permitido a avaliação dos aspectos emocionais e

cognitivos envolvidos no processo de estímulo nocivo (MUÑOZ-ABELLÁN; ARMARIO; NADAL, 2010; MALATYNSKA et al., 2012; WANG et al., 2012).

### 2.1.1 Classificação da dor

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

A dor aguda é uma resposta neurofisiológica normal e previsível a um estímulo lesivo de origem mecânica, térmica ou química. Geralmente é tempo-limitada e se resolve com a cessação do estímulo nocivo (FISHMAN et al., 2010). A persistência do quadro algico além do período esperado de recuperação do organismo caracteriza a condição de dor crônica. Na literatura, considera-se dor crônica quando o sintoma ultrapassa 3 a 6 meses de duração (LOESER; MELZACK, 1999).

Quanto a origem, a dor pode ser dividida em (1) nociceptiva, quando há ativação direta de nociceptores após lesão tecidual (MILLAN, 1999); (2) inflamatória, sustentada pela sensibilização dos nociceptores por mediadores inflamatórios; (3) neuropática, originada como consequência direta de uma lesão ou doença afetando o sistema somatossensorial periférico ou central (LOESER; TREEDE, 2008); (4) psicogênica, quando há prevalência de fatores psicológicos na gênese do processo doloroso. Esse tipo dor pode ser observado em distúrbios psicológicos como depressão e ansiedade generalizada (MERSKEY, 1986; FÜRST, 1999; NAKAMURA et al., 2014).

### 2.1.2 Dor aguda

Em 1990, um conjunto de Cirurgiões e de Anestesiologistas do Colégio Real, na Inglaterra, afirmaram que o tratamento da dor pós-operatória em hospitais Britânicos estava sendo inadequado e sem avanço significativo. Porém, somente em 1998, foi descrito o primeiro serviço de tratamento da dor aguda visando acelerar a recuperação e o processo de alta, bem como incluir precocemente o indivíduo no processo de reabilitação (ONOFRE et al., 2009).

De acordo com o *National Center for Health Statistics* – EUA, estima-se que anualmente 80% dos pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos apresentam dor aguda, causando um grande impacto econômico para o país. Em 10-50% dos casos, a dor aguda pode ser seguida por dor persistente em pacientes submetidos a diferentes tipos de procedimentos cirúrgicos (KEHLET et al., 2006), comprometendo ainda mais a qualidade de vida desses indivíduos.

Visto isso, há uma clara necessidade de novos tratamentos ou o aprimoramento das modalidades analgésicas existentes para assegurar o controle da dor aguda e contribuir para o bem estar e satisfação dos pacientes.

### 2.1.3 Fisiopatologia da dor

Após uma lesão tecidual inicia-se um ciclo de eventos que vão desde a periferia até os centros superiores, com o objetivo de identificar o local da lesão, discriminar sua origem (mecânica, térmica ou química) e gerar uma resposta fisiológica frente a agressão (BESSON e PERL, 1969).

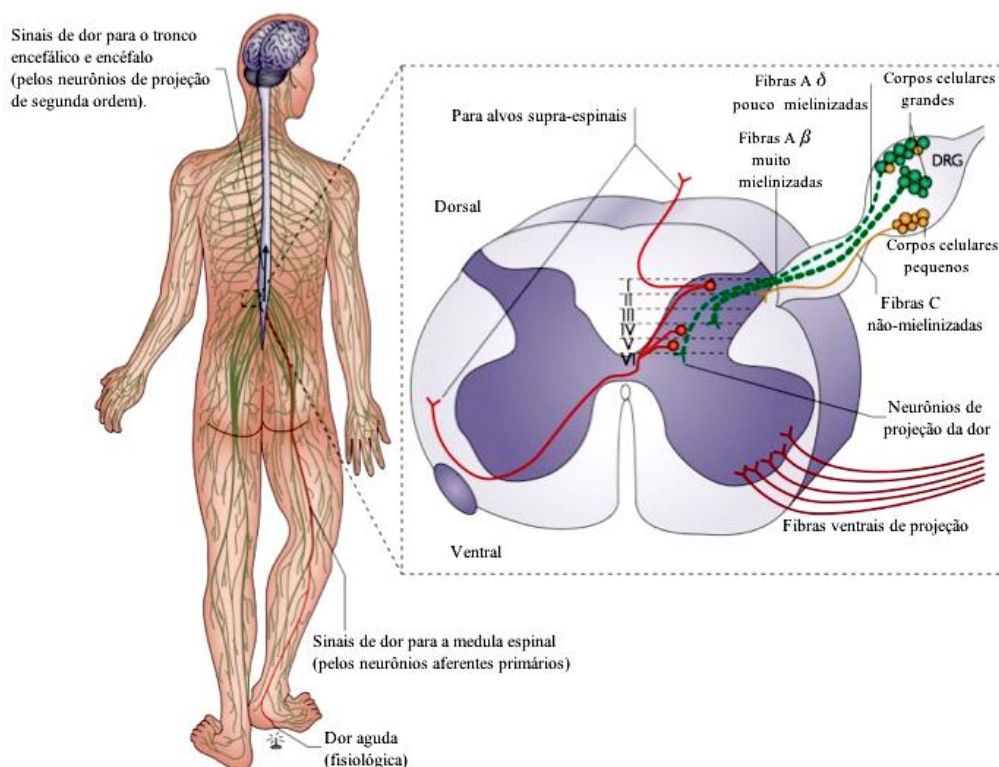
O primeiro passo na sequência dos eventos que originam o fenômeno doloroso é a transformação dos estímulos nocivos em potenciais de ação (transdução sensorial) que, das fibras nervosas periféricas, são transferidos para o sistema nervoso central (transmissão sensorial) (BESSON e PERL, 1969). O segundo estágio é referente ao processamento elaborado dessa informação nociceptiva, levando à percepção consciente da dor (BALDO, 1999).

#### 2.1.3.1 Nociceptores

O processo de transdução ocorre a partir do estímulo de estruturas periféricas específicas para dor, os nociceptores. Estes são as terminações nervosas livres das fibras aferentes sensoriais de primeira ordem (Figura 1) (FÜRST, 1999). Eles são ativados quando o estímulo é intenso, ultrapassando um alto limiar de ativação (BURGESS; PERL, 1967;

MILLAN, 1999). A função básica dos nociceptores é de transmitir informações sobre a lesão tecidual ocasionada por estímulos nocivos aos neurônios de ordem superior (FÜRST, 1999).

Os nociceptores estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras (JULIUS; BASBAUM, 2001). Dividem-se em quatro classes: os mecanoceptores, sensíveis a estímulos mecânicos intensos; os termoceptores, sensíveis a estímulos térmicos (acima de 45°C ou menor que 5°C), os polimodais, sensíveis tanto a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (TEIXEIRA; CORREA; PIMENTA, 1994; BESSON, 1999) e os chamados nociceptores silenciosos (*silente ou sleeping*) os quais existem em pequena proporção nas fibras aferentes primárias e não respondem normalmente a estímulos. No entanto, quando estimulados por mediadores inflamatórios ou após a administração de agentes flogísticos (pró-inflamatórios), estes nociceptores apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizados e assim, passam a responder a estímulos sensoriais mecânicos e térmicos (JULIUS; BASBAUM, 2001; FEIN, 2011).



### Figura1 – Nocicepção

Legenda. O desenho esquemático acima mostra uma seção transversal da medula espinal incluindo o corno dorsal da medula espinal e o gânglio da raiz dorsal (DRG). O DRG contém os neurônios sensoriais pseudo-unipolares. Os corpos celulares dos neurônios nociceptivos se localizam no DRG e são amplamente classificados nos tipos: grandes e pequenos. Os estudos de marcação imunoistoquímica mostram que as fibras C de condução lenta e as fibras A $\delta$  têm corpos celulares de pequeno diâmetro, enquanto que as fibras A $\beta$  com velocidade de condução mais rápida, possuem corpos celulares maiores.

Fonte: Adaptada de Milligan e Watkins (2009).

### 2.1.3.2 Canais iônicos

Como explicado anteriormente, subsequente à ocorrência da transdução sensorial do estímulo nocivo em potencial de receptor, a resposta deve ser transformada ou codificada em uma série de potenciais de ação para a informação ser transmitida à medula espinal.

Os estímulos nociceptivos de origem mecânica, térmica ou química podem ativar canais iônicos específicos presentes nos terminais periféricos de fibras aferentes nociceptivas.

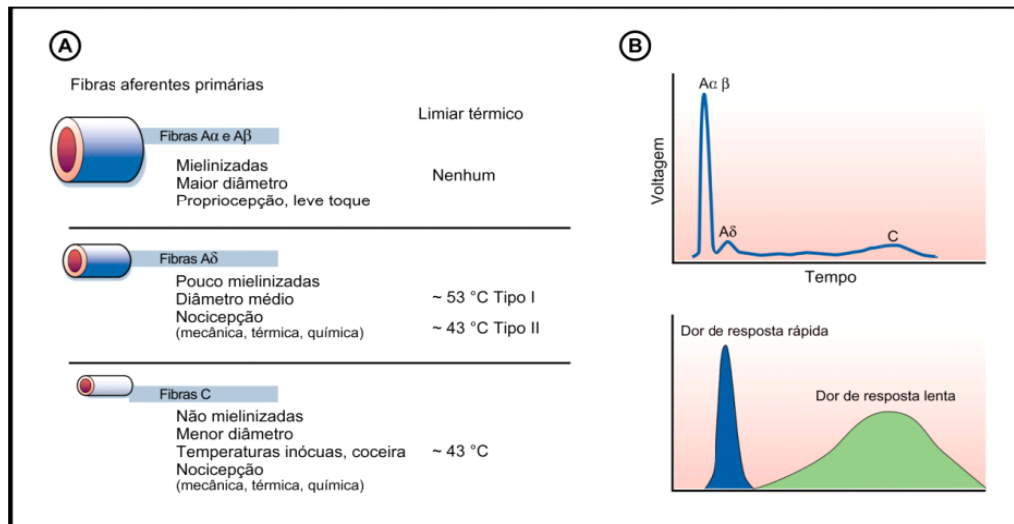
Esta ativação gera correntes despolarizantes que, dependendo da intensidade, iniciam os disparos dos potenciais de ação por ativação destes canais. Estes são os canais de íons controlados por voltagem (VGICs) e dentre eles temos os canais de sódio controlados por voltagem de subunidade alfa (NaV), os canais de cálcio controlados por voltagem (CaV) e os canais de cátions controlados por nucleotídeos cíclicos ativados por hiperpolarização (HCN). Os canais de potássio controlados por voltagem (KV) estão envolvidos na repolarização da membrana da célula (FEIN, 2011).

### 2.1.3.3 Fibras nociceptivas

As fibras nociceptivas por onde trafegam os estímulos de natureza mecânica, térmica ou química que podem ser classificadas de acordo com a modalidade sensorial, diâmetro e velocidade de condução do potencial de ação (Figura 2) (FEIN, 2011).

Dessa forma, fibras A $\alpha$  e A $\beta$  representam os proprioceptores e receptores mecânicos de baixo limiar e são especializadas na condução do estímulo mecânico inócuo, apresentam velocidade de condução rápida e são particularmente abundantes na derme e epiderme. Por outro lado, algumas fibras com diâmetros menores (A $\delta$  e C) são terminações nervosas livres periféricas, mostram alto limiar de ativação e são responsáveis por detectar estímulos nocivos, ou seja, nocicepção. Devido à diferença na velocidade de condução entre as fibras A $\delta$  e C, o sinal das fibras A $\delta$  chegam à medula espinal antes das fibras C demonstrando que o estímulo doloroso evoca duas sensações de dor sucessivas e possivelmente distintas. Assim, fibras A $\delta$  são responsáveis pela detecção da dor rápida e aguda (“primeira dor”/dor em picada), enquanto que as fibras C são condutoras da dor lenta e difusa (“segunda dor”/dor em queimação) (MILLAN, 1999). Os nociceptores mecânicos e térmicos possuem fibras do tipo

A $\delta$  enquanto as fibras C conduzem informação oriunda de nociceptores polimodais e silenciosos (FEIN, 2011).



**Figura 2 – Fibras sensoriais aferentes primárias e suas características**

Ilustração das fibras sensoriais e os diferentes tipos de estímulos conduzidos pelas fibras aferentes primárias. Enquanto as fibras mielinizadas e de maior diâmetro (fibras A $\alpha$  e A $\beta$ ) são responsáveis pela detecção de estímulos não nocivos, as fibras de menor diâmetro, pouco ou não mielinizadas (fibras A $\delta$  e C, respectivamente) são responsáveis pela detecção de estímulos nocivos (A). A velocidade de condução está relacionada ao diâmetro da fibra (B), sendo as fibras do tipo A $\delta$  responsáveis pela resposta rápida e as fibras do tipo C responsáveis pela resposta lenta.

Fonte: Adaptado de Julius e Basbaum (2001).

#### 2.1.3.3.1 Vias da transmissão nociceptiva

A partir da transmissão da informação nociceptiva ao neurônio de segunda ordem, esta ascenderá para múltiplas áreas supraespinais através de tratos neuronais específicos (vias de projeção da dor ou trato anterolateral da medula espinal). As principais vias de condução da dor no sistema nervoso central (SNC) são o trato espinotalâmico, trato espinoreticular e o trato espinomesencefálico (espinoparabraquial).

O trato espinotalâmico transmite informações da medula espinal para o tálamo sobre dor, temperatura, pressão e tato. Cursa lateralmente no tronco encefálico, envia projeções ao núcleo ventrobasal do tálamo projetando-se para o córtex somatosensorial. É dividido em

neoespinotalâmico e paleoespinotalâmico (LOESER et al., 1999; BASBAUM; JESSEL, 2000).

A via neoespinotalâmica é a via clássica da dor. Transmite a dor rápida, formada por fibras contíguas às fibras A $\delta$ , chega a pontos específicos do tálamo e filogeneticamente é a via mais evoluída. O glutamato é o principal neurotransmissor. A sensação dolorosa percebida por esta via é epicrítica, ou seja, é precisa, bem definida, bem localizada, intensificada e discriminada. Possui poucas estações sinápticas e se projeta no núcleo ventral póstero-lateral do tálamo, cujos neurônios recebem o nome de terciários (neurônios de terceira ordem), os quais projetam-se para o córtex somatossensorial, onde ocorre o processamento da informação nociceptiva (BEAR; CONNORS; PARADISO, 1996; BASBAUM et al., 2009).

A via paleoespinotalâmica é a via que transmite a dor lenta, formada por fibras contíguas às fibras C e possui várias estações sinápticas. Nesta via há envolvimento de glutamato, substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). A informação é gradativa, prolongada e muito difusa. Uma parte das fibras vai ao tálamo e deste ao córtex somestésico, mas a maioria se dirige à formação reticular mesencefálica e, a partir destas áreas, a informação é enviada para o córtex límbico e frontal, hipotálamo e núcleos motores. O sistema límbico é responsável pela resposta de alerta e fuga e respostas emocionais desagradáveis ao estímulo doloroso (BEAR; CONNORS; PARADISO, 1996; LOESER; MELZACK, 1999; BASBAUM; JESSEL, 2000). Esse tipo de dor não consegue ser analisada com precisão, nem sua localização, intensidade e características, uma vez que a sensação dolorosa percebida por esta via é protopática (primitiva, sem refinamento) (LOESER et al., 1999; BASBAUM; JESSEL, 2000).

O trato espinoreticular é anatomicamente menos individualizado. Os neurônios deste trato se originam da lâmina V e sobem no quadrante contralateral conjuntamente com fibras do trato paleoespinotalâmico. Este trato representa um papel importante na sensação da dor, especialmente na dor crônica profunda. Cursa medialmente no tronco encefálico e está ligado ao Sistema Reticular Ativador Ascendente (SARA) e a Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG, sigla em inglês). Envia projeções difusas para o tálamo, córtex somestésico e estruturas do sistema límbico (RUSSO; BROSE, 1998).

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

#### 2.1.4 Percepção e processamento da dor

O tálamo desempenha um papel fundamental na integração do impulso doloroso. É nele que ocorre a percepção inconsciente da informação dolorosa. Posteriormente, os neurônios de terceira ordem transmitem impulsos para o córtex somatossensorial e giro do cíngulo. No córtex somatossensorial ocorre o processamento que resulta em dor consciente (FÜRST, 1999) e no giro do cíngulo é processada a qualidade emocional ou afetiva da dor, enviando impulsos de volta para o córtex somatossensorial. Neste processo originam-se qualidades mais precisas, como tipo de dor, localização e ansiedade emocional. Dessa maneira, a informação nociceptiva alcança as áreas sensoriais do córtex somestésico, onde aspectos como qualidade, intensidade, localização e duração do estímulo nociceptivo serão integrados e componentes afetivos e emocionais serão interpretados e contextualizados, levando à percepção total do estímulo nociceptivo (RUSSO; BROSE, 1998; MILLAN, 1999).

#### **2.2 Mediadores inflamatórios e nocicepção**

Como supracitado, o primeiro passo na sequência dos eventos que originam o fenômeno doloroso é a transformação dos estímulos agressivos em estímulos elétricos (potenciais de ação) conduzidos por fibras nervosas periféricas até SNC (BESSON; PERL, 1969; BASBAUM et al., 2009). Porém, muitas vezes tal estímulo provoca uma lesão tecidual seguida de um processo inflamatório com consequente hipersensibilidade, onde a estimulação constante dos nociceptores leva a alterações neuroplásticas no SNC e periférico (SNP) conduzindo à manutenção do estado algico (WOOLF e SALTER, 2000; McMAHON et al., 2005). Isso ocorre, uma vez que os mediadores gerados nesta atividade inflamatória ativam diretamente ou indiretamente os nociceptores sensibilizando-os (diminuindo seu limiar de ativação e/ou aumentando a responsividade dos terminais periféricos, conhecido como sensibilização periférica) e/ou aumentando a transmissão sináptica na medula espinal, sensibilização central), fenômenos estes que são os principais mecanismos que contribuem para a gênese e manutenção da dor inflamatória, muitas vezes acompanhada de hiperalgesia térmica e mecânica (WANG; WOOLF, 2005; BASBAUM et al., 2009).



Desta forma, a meta ao investigar a dor, é identificar os mediadores químicos que são liberados nos tecidos lesionados e responsáveis pela ativação direta ou sensibilização dos nociceptores, o que culmina com o quadro de hiperalgesia, assim como eleger novas substâncias/moléculas que sejam capazes em inibir sua síntese, liberação ou ligação em seus receptores.

### 2.2.1 Sensibilização periférica

Após a lesão tecidual, o processo inflamatório se inicia com alterações no fluxo sanguíneo e na permeabilidade vascular, ativação e migração de células imunes e alterações na liberação de fatores tróficos e fatores de crescimento (DRAY, 1995). Além disso, há um acúmulo de fatores endógenos liberados a partir de nociceptores ativados ou de células não-neuronais que residem ou se infiltram na área lesionada (como mastócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos). Coletivamente, estes fatores endógenos são chamados de “sopa inflamatória” e representam uma ampla ordem de moléculas sinalizadoras, que incluem neurotransmissores excitatórios (glutamato), neuropeptídeos (SP, CGRP e galanina), eicosanoides (prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), tromboxanos e leucotrienos), aminas (serotonina, histamina), cininas (bradicinina), purinas (ATP), proteases (serina-triptase, tripsina, trombina), neurotrofinas (fator de crescimento neuronal (NGF, do inglês, *nerve growth factor*), óxido nítrico (NO, do inglês, *nitric oxide*), citocinas (interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), quimocinas (fractalquina), bem como prótons extracelulares (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; GRIFFIS; COMPTON; DOERING, 2006; BASBAUM et al., 2009).

Os neurônios nociceptivos, por sua vez, expressam receptores para cada uma dessas substâncias pró-inflamatórias/pró-álgicas, sendo que essas interações aumentam a excitabilidade das fibras nervosas, levando a intensificação da sensibilidade mecânica e térmica, caracterizada pelos quadros de hiperalgesia e alodínia, coletivamente referidos como hipersensibilidade (DRAY, 1995; McMAHON et al., 2008; BASBAUM et al., 2009). Alguns exemplos de receptores, presentes nas fibras sensoriais primárias, capazes de interagir com os mediadores inflamatórios incluem canais iônicos de potencial transitório (TRPs, do inglês *transient receptor potential*) e canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs), ambos ionotrópicos

(controlados por ligantes), receptores GPCRs, (do inglês, *G protein-coupled receptor*) e TrK (do inglês, *tropomyosin-related kinase*), ambos metabotrópicos (JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM et al., 2009).

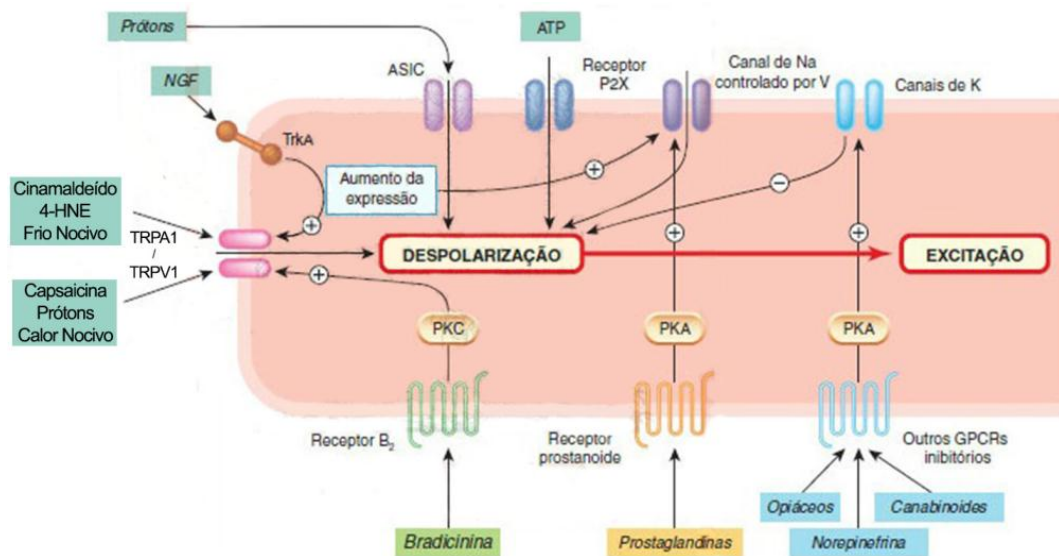
Dentre os receptores são admitidos algumas particularidades. Por exemplo, a modulação de canais iônicos pode ocorrer de maneira direta, quando o mediador inflamatório, tal como prótons extracelulares, liga-se direto aos receptores ASICs e TRPV1; ou indireta quando uma cascata de sinalização intracelular necessariamente é iniciada para o mesmo fim. Um exemplo clássico deste tipo de modulação é a bradicinina, cuja ligação ao receptor B2 induz a ativação da via da fosfolipase C (PLC), que por sua vez pode induzir a ativação da via adenilato ciclase/AMPC e dos alvos *downstream* como as proteínas cinases PKC e a PKA. Estas são capazes de levar à ativação de canais TRPV1 e TRPA1, envolvidos na hipersensibilidade mecânica e térmica (WANG et al., 2008; BASBAUM et al., 2009). Vale ressaltar que mediadores como a PGE2 e histamina produzem hiperalgesia mecânica por meio de ativação da cascata AMPC/PKA, enquanto outros mediadores, como por exemplo a adrenalina, endotelinas e a bradicinina, parecem envolver a ativação da PKC para o desenvolvimento da hiperalgesia (KHASAR et al., 1999; ALEY et al., 2001; LEVY e STRASSMAN, 2002; SACHS et al., 2009).

Uma vez fosforilada, as proteínas cinases ativam sítios específicos em proteínas-alvo, levando a mudanças transcricionais ou pós-translacionais, responsáveis por inúmeras respostas fisiológicas, incluindo a percepção da dor (YAJIMA et al., 2003). Estudos têm mostrado que na via AMPC/PKA, ao menos três eventos modulatórios de canais iônicos voltagem-dependentes potencializam a excitabilidade dos nociceptores, a citar: a (1) amplificação das correntes de  $\text{Na}^+$  em canais resistentes à tetrodotoxina, expressos em uma subpopulação de fibras sensoriais de pequeno diâmetro; (2) supressão das correntes retificadoras sustentadas de  $\text{K}^+$ , (possivelmente responsáveis pela modulação do limiar de disparo); e (3) aumento das correntes de cátion ativadas por hiperpolarização, relacionadas, presumivelmente, com a facilitação do disparo repetitivo (LEVY; STRASSMAN, 2002). Além disso, o recrutamento de receptores *silente* insensíveis a estímulos mecânicos contribuem para a diminuição do limiar de ativação das fibras aferentes, levando à hiperalgesia e à alodínia (CUNHA et al., 1999; LEVY; STRASSMAN, 2002).

Há de se considerar, que os mecanismos envolvidos na sensibilização dos nociceptores são complexos e muitas vezes inter-relacionados, de modo que a ativação de PKA pode aparecer como um fenômeno prévio à ativação de PKC, ou vice-versa (OTUKI et al., 2005; PINTO et al., 2008). Contudo, a ativação das vias PKA e PKC não são as únicas moduladoras

da sensibilidade nociceptiva. Estudos têm mostrado que as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), em especial as cinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK 1/2) (LEVY e STRASSMAN, 2002; VILLARREAL et al., 2009) tem papel relevante na indução da hipersensibilidade por meios independentes da ativação de PKA ou PKC. Desta forma, sabe-se que essas vias de sinalização estão envolvidas no aumento da excitabilidade dos nociceptores, embora os mecanismos exatos desta ação não sejam totalmente esclarecidos (ALEY et al., 2001; WANG et al., 2008; VILLARREAL et al., 2009).

Conforme descrito anteriormente, as fibras aferentes primárias detectam os estímulos nociceptivos e os transmitem ao sistema nervoso na forma de corrente elétrica. Para tanto, os terminais nociceptivos expressam uma variedade de receptores e canais iônicos, que uma vez ativados por um dano tecidual iniciam a transmissão do impulso nervoso (AKOPIAN, 2011). Dentre os tipos de transdutores da informação sensorial, os membros da família de receptores de potencial transitório (TRPs) têm sido amplamente estudados pelos seus efeitos sobre a função celular e vias de sinalização modulatória da dor (BASBAUM et al., 2009).



**Figura 3 – Canais, receptores e mecanismos de transdução de terminações aferentes nociceptivas**

Destaque para canais TRPA1: podem ser ativados diretamente pelo cinamaldeído, 4-HNE, e frio nocivo e TRPV1: podem ser ativados diretamente pela capsaicina, prótons (que também ativam canais ASIC) e calor nocivo. Indiretamente podem ser ativados por mediadores inflamatórios, como a bradicinina, que ao se ligar em receptores B<sub>2</sub> ativam a via PLC/PKC sensibilizando canais TRPA1 e TRPV1. A PGE<sub>2</sub>, ao ligar-se em receptores EP1 também ativa a via PLC/PKC (não mostrada na figura), enquanto ao ligar-se aos receptores EP2/EP4 ativa a via AMPc/PKA, ativando canais NaV e sensibilizando TRPA1 e TRPV1 (não mostrado na figura). A ativação dos canais TRPA1 ou TRPV1 (qualquer que seja a via) leva a uma abertura do canal permitindo o influxo de íons (especialmente Ca<sup>2+</sup> e Na<sup>+</sup>, não mostrados na figura) gerando ondas despolarizantes com consequente excitação neuronal.

Fonte: Adaptado de Rang et al., (2011).

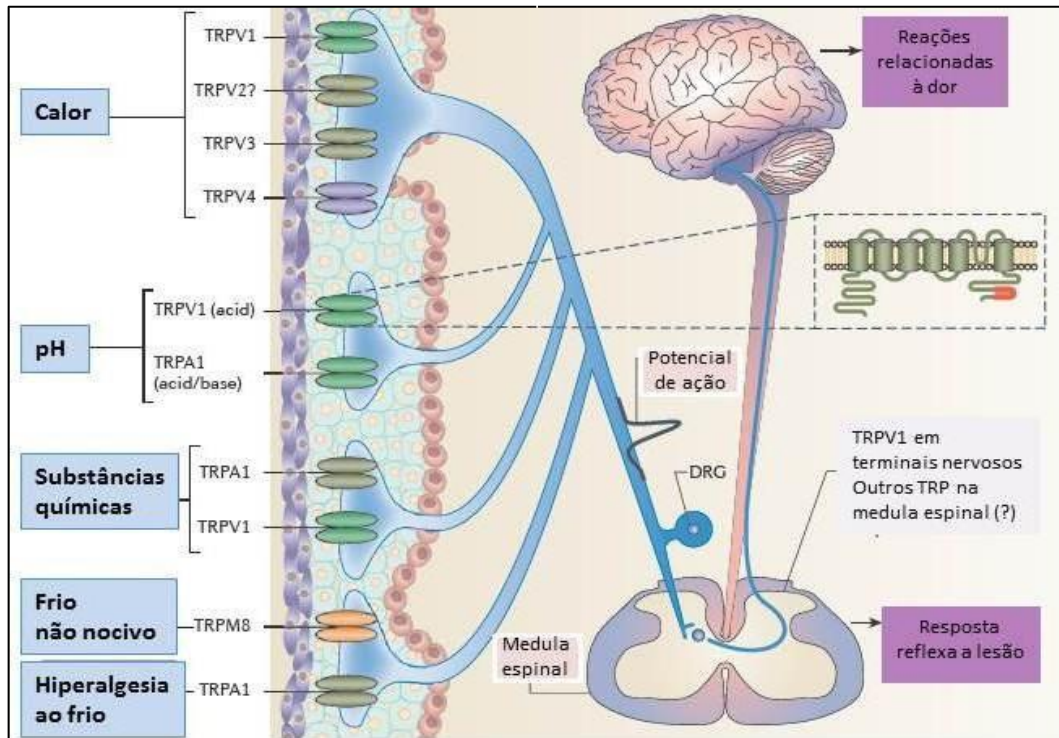
### 2.3 O papel dos receptores de potencial transitório – TRPs

Os TRPs compreendem uma superfamília de canais iônicos permeáveis a cátions, recebendo destaque por apresentarem uma diversidade na seletividade iônica, nos modos de ativação e nas funções fisiológicas (MONTELL, 2005). São divididos em seis subfamílias, de acordo com a homologia da sequência de proteínas: TRPC (canônico), TRPV (vanilóide), TRPM (melastatina), TRPA (anquirina), TRPP (policistina) e TRPML (mucolipina). Em sua estrutura geral, os canais TRPs possuem seis domínios transmembrana, e tanto o terminal amino quanto o terminal carboxila são intracelulares (MORAN et al., 2011).

Vários canais TRPs são ativados diretamente por substâncias naturais, e os canais das subfamílias vanilóide (em especial TRPV1, TRPV2, TRPV3 e TRPV4), melastatina (em especial TRPM8) e anquirina (TRPA1) são sensíveis a estímulos térmicos, sendo denominados de termoreceptores ou termo-TRPs. Assim, os canais TRPV1 e TRPV2 são ativados por calor nocivo (na faixa de 43°C e 52°C, respectivamente), enquanto TRPV3 e TRPV4 respondem ao calor não nocivo (de 34 -38°C e de 27°C -34°C, respectivamente). Por outro lado, os canais TRPM8 são sensibilizados em temperaturas média de 23 a 26°C (CALIXTO et al., 2005; MONTELL, 2005; CORTRIGHT et al., 2007). Enquanto os canais TRPA1 estão associados à percepção do frio, sendo ativado por temperatura inferior a 17°C. Além disso, substâncias naturais como cinamaldeído (extraído da canela), por produtos do estresse oxidativo como peróxido de hidrogênio bem como por força mecânica são capazes de sensibilizar esses canais (MORAN et al., 2011; PREMKUMAR e ABOOJ, 2012).

Já se sabe que ambos TRPV1 e TRPA1 agem como moduladores importantes na transdução e na sensibilização em neurônios somatosensoriais aferentes primários. A expressão desses canais nos neurônios sensoriais que se projetam ao corno dorsal da medula espinal (CDME), sugere seu potencial envolvimento na modulação da liberação sináptica de neurotransmissores (CORTRIGHT et al., 2007) e os tornam capazes de iniciar o impulso nervoso sensorial após a detecção de estímulos químicos, mecânicos e térmicos (STUCKY et al., 2009; MORAN et al., 2011). Vale ressaltar que uma possível interação funcional entre os receptores TRPA1 e TRPV1 parece existir, uma vez que ambos são expressos na maioria das fibras aferentes A e C (STORY et al., 2003; ANDRADE et al., 2006). Logo, em estado inflamatório ocorre à ativação de canais TRPA1 e sensibilização de canais TRPV1 (CORTRIGHT et al., 2007; AKOPIAN, 2011), ampliando o quadro de hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio, bem como hipersensibilidade térmica ao calor no processo

inflamatório (AKOPIAN, 2011). A Figura 4 ilustra os principais termo-TRPs envolvidos na nocicepção, bem como seus potenciais ativadores.



**Figura 4 – Principais termo-TRPs envolvidos na transmissão nociceptiva e seus principais ativadores**

Múltipla expressão de TRPs nos neurônios sensoriais e seus principais ativadores. Membros da subfamília TRPV respondem a estímulos térmicos, sendo TRPV1 e TRPV2 responsivos ao calor nocivo, enquanto TRPA1 e TRPM8 respondem a estímulos frios. TRPV1 e TRPA1 são também ativados por substâncias químicas (por exemplo, capsaicina e cinamaldeído, respectivamente) e por alterações no pH.

Fonte: Adaptado de Moran et al., (2011).

## 2.4 Controle da dor: Vias descendentes analgésicas

Além das grandes vias ascendentes apresentadas anteriormente, há vias descendentes bem desenvolvidas que visam suprimir as aferências nociceptivas. A modulação (facilitação ou inibição) da dor existe na forma de um circuito modulatório, com aferências em múltiplas áreas, incluindo o hipotálamo, a amígdala, o córtex cingulado anterior rostral (rACC), se dirige para a região da substância cinzenta periaquedutal (PAG), e com eferências da PAG para o bulbo. Os neurônios que se localizam no núcleo magno da rafe e no núcleo reticular

gigantocelular, que estão incluídos no bulbo ventromedial rostral (RVM), se projetam para a medula espinal (corno dorsal) para, direta ou indiretamente, aumentar ou diminuir o tráfego nociceptivo, modificando a experiência da dor (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2005; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

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

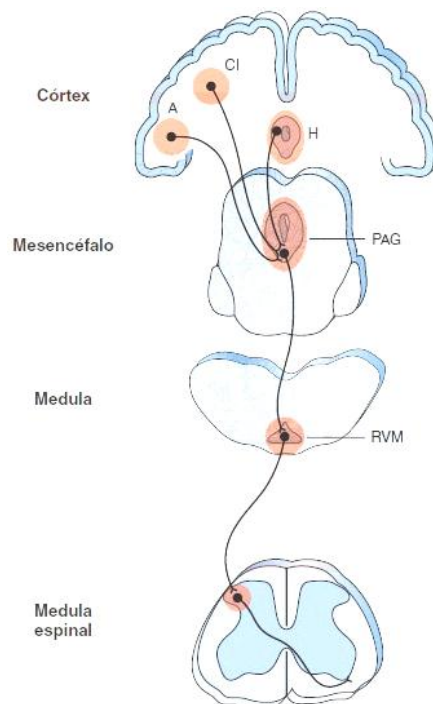
Os principais moduladores no controle descendente da dor são os sistemas opioidérgico, monoaminérgico GABAérgico, adenosinérgico, além dos canabinóides endógenos (MILLAN, 2002; BASBAUM et al., 2009). Todavia, os efeitos do sistema modulatório descendente sobre o processo nociceptivo no corno dorsal da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

#### 2.4.1 Sistema Opioide

Os receptores opioides possuem uma distribuição seletiva, localizados em grande quantidade nas estruturas cerebrais que compõe o sistema límbico (tálamo, hipotálamo, amígdala, hipocampo), substância periaquedutal, bem como lâminas I, II, IV do corno dorsal da medula espinal e SNP (HARLAN; ELISABETH, 2002). Os receptores opioides são observados em áreas correlacionadas com percepção da dor (lâminas I, II e V), modulação do comportamento afetivo (amígdala, hipocampo, locus coeruleus e córtex) e a regulação do sistema nervoso autônomo e funções neurodegenerativas (bulbo e hipotálamo) (ARVIDSSON et al., 1995a,b). Estudos mostram que o efeito analgésico dos opioides é devido a sua propriedade em inibir, de maneira direta, a transmissão ascendente das informações

nociceptivas provenientes do corno dorsal da medula espinal e ativar os circuitos de controle da dor que descendem do mesencéfalo pelo bulbo ventromedial rostral e chegam ao corno dorsal da medula espinal (STEIN, 1994). Assim, os peptídeos opioides e seus receptores são encontrados em todos esses circuitos descendentes da dor (GUTSTEIN et al., 1998).

Os tipos de receptores opioides são mi ( $\mu$ ), kappa ( $\kappa$ ) e delta ( $\delta$ ). Eles diferem entre si por diferentes afinidades aos ligantes opioides endógenos e também às drogas opioides exógenas. Os principais ligantes opioides são: encefalina, seletiva para receptores tipo delta; dinorfina, seletiva para receptores tipo kappa; e endorfina a qual possui alta afinidade para receptores tipo delta e mi e baixa afinidade para receptores tipo kappa (LORD et al., 1977). Todos eles são acoplados a proteína G e inibem a adenilato ciclase, reduzindo assim o conteúdo intracelular de AMPc (DHAWAN et al., 1996). As encefalinas, por exemplo, que estão presentes nos interneurônios da substância gelatinosa da medula espinal, apresentam efeitos antinociceptivos que parecem ser ativados pelas ações pré e pós-sinápticas por inibir a liberação de substância P e diminuir a atividade das células que se projetam da medula espinal para os centros mais altos do SNC (HOFFMAN; TAYLOR, 2003).



**Figura 5 – Sistema de controle descendente da dor e sítios de ação dos opioides**

A Substância cinzenta periaquedutal (PAG) recebe estímulos dos centros superiores e é o principal centro de débito do sistema límbico. Ela se projeta para o bulbo rostral ventromedial (RVM) e deste, as fibras inibitórias se projetam para o corno dorsal da medula espinal. As áreas sombreadas indicam as regiões que expressam os receptores opioides  $\mu$ . CI (córtex insular), A (amígdala), H (hipotálamo).

Fonte: Adaptado de Rang et al., (2011).

#### 2.4.2 Sistema Adenosinérgico

A adenosina é um nucleosídeo derivado do ATP, formado a partir do AMP pela ação da enzima 5-nucleotidase (SAWYNOK, 1998; SAWYNOK e LIU, 2003). Trata-se de uma molécula com ação neuromoduladora e está envolvida em muitas funções fisiológicas no SNC e no SNP (RIBEIRO; SEBASTIÃO, 2002). Entre as funções que a adenosina exerce estão as de regulação do sono, a ansiedade, memória, cognição e da dor. A regulação dos níveis endógenos de adenosina se dá através da sua produção, do seu metabolismo e transporte (DUNWIDDIE; MASINO, 2001; RIBEIRO; SEBASTIÃO, 2010).

Estudos pré-clínicos têm mostrado que a adenosina e seus análogos produzem ações antinociceptivas na dor nociceptiva e inflamatória. Em modelos de lesão nervosa periférica, a adenosina é capaz de prevenir/reverter à dor neuropática (BASTIA et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2010). Corroborando com estes resultados, estudos clínicos mostraram que em pacientes com dor neuropática, a administração de adenosina reduziu a dor espontânea, a alodínia tátil e térmica, bem como a hiperalgesia térmica (QU; COONEY et al., 1997; LYNCH; CLARK et al., 2003). Outro estudo interessante demonstrou que pacientes com dor neuropática apresentavam níveis sanguíneos reduzidos de adenosina. Além disso, a infusão intravenosa de adenosina durante cirurgia torácica reduziu a dor pós-operatória (GUIEU; COURAUD et al., 1996; GUIEU; et al., 2015).

Existem quatro subtipos conhecidos de receptores de adenosina (ARs) denominados de A1, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A3, todos são acoplados a proteínas G. Esta classificação e nomenclatura são baseadas nas características bioquímicas, moleculares e farmacológicas destes receptores. (JACOBSON; GAO, 2006; FREDHOLM, 2014).

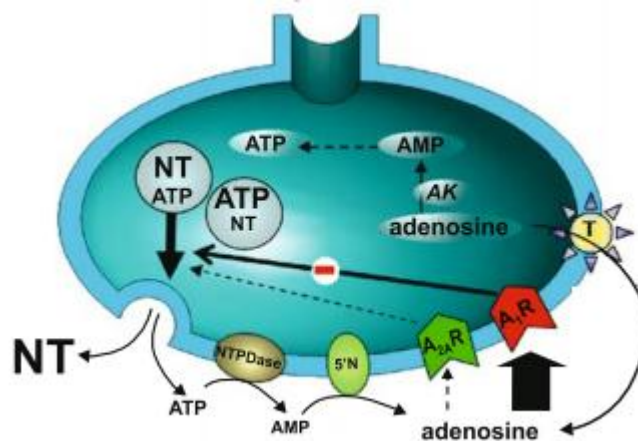
Os receptores para adenosina estão altamente implicados na modulação da nocicepção, principalmente os A1 e A2A (SAWYNOK, 2007). O receptor A1 é o principal responsável por induzir analgesia (FREDHOLM et al., 2014; SAWYNOK e LIU, 2003). Está bem estabelecido que o A1 é amplamente distribuído na medula espinal dorsal, principalmente na lamina II (substância gelatinosa), bem como no corpo celular de neurônios aferentes primários (HORIUCHI; OGATA et al., 2010; LIMA; SOUZA et al., 2010).

Tem sido descrito na literatura que a ativação dos receptores A1 implica no controle da dor aguda (NASCIMENTO; FIGUEREDO et al., 2010; SONG; HAHM et al., 2011). Provavelmente, estes efeitos são causados pela estimulação de receptores supraespinhais, espinhais e periféricos. Ainda, Lima, Souza et al., 2010 mostraram que os efeitos



antinociceptivos mediados pelos receptores A1 relacionam-se com a via de sinalização intracelular dependente do NO/cGMP. A predominância de receptores A1 nas diferentes fibras aferentes também foi demonstrada, quando após a lesão nervosa periférica, o uso de agonistas A1 reduziu a hiperalgesia térmica, mas não a mecânica (CAIRNS, 2009). Este achado permitiu concluir que as fibras tipo C conservam grande parte dos receptores A1, quando comparado às fibras do tipo A, responsáveis pela condução do estímulo mecânico.

O receptor A2A, acoplado à proteína Gs (na sua maioria) ou à proteína Golf (principalmente no estriado), também é encontrado no SNC e periférico, mas sobretudo, no núcleo acumbens, putamen, timo, músculo liso vascular, endotélio, plaquetas e neurônios sensoriais primários (CARRUTHERS et al. 2001; LAZARUS, 2011). O principal evento intracelular após a ativação do receptor A2A é a estimulação da adenilato ciclase e consequente aumento da produção de AMPc, o qual pode induzir a ativação da PKA, que se torna capaz de ativar PKC, canais de  $Ca^{+2}$ , canais de  $K^{+}$ , elemento responsivo ligador de AMPc (CREB), MAPK, fosfolipase C entre outros (BURNSTOCK, 2011; CUNHA, et al., 2008). No entanto, alguns autores demonstraram que o A2A ativado reduz a nocicepção em vários modelos animais (BY et al., 2011; NASCIEMNTO, 2010; YOON et al., 2005).



**Figura 6 – Fontes de adenosina nos botões sinápticos – low frequency – acute stress**

Representação esquemática da capacidade do metabolismo da adenosina e ATP para determinar qual efeito mediado por receptores de adenosina extracelular. Assim, em frequências mais baixas da estimulação, há uma menor liberação de ATP, que formará quantidades baixas de adenosina, permitindo que os transportadores de nucleosídeos contribuam para o acúmulo de adenosina extracelular, favorecendo a ativação dos receptores A1. Em frequências mais altas de estímulo, a liberação de ATP é desproporcionalmente maior, os níveis extracelulares de adenosina serão essencialmente derivados de ATP (após seu catabolismo por ecto-nucleotidases), levando a uma ativação preferencial de receptores A2A (não mostrado na figura), que estão nas proximidades do ecto-5'-nucleotidase. ADO, adenosina; AK, quinase de adenosina; NT, neurotransmissor (no caso, glutamato); NTPDase, DRÖGE capaz de converter ATP ou ADP em AMP; 5'-N, ecto-5'-nucleotidase; T, transportadores equilibrativos de nucleosídeo.

Fonte: Cunha (2005).

## 2.5 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é formado a partir de L-arginina pela ação de formas neuronais e não neuronais da NO sintase [nNOS (neuronal); eNOS (endotelial) ou iNOS (induzível)] (ESPLUGUES, 2002). Trata-se de uma molécula de sinalização central que desempenha um papel importante em estados agudos e crônicos de dor, a nível central e periférico. O NO e as suas enzimas associadas estão envolvidos em muitos processos fisiológicos e patofisiológicos (OLSON; VAN DER VLIET, 2011).

Em vertebrados superiores, o NO tem um papel fundamental na manutenção da homeostase da musculatura lisa (especialmente no músculo liso vascular) e dos neurônios do trato gastrointestinal. Além disso, o NO está intimamente envolvido na regulação da digestão, vigília, função sexual, percepção da dor e prazer, recuperação da memória e do sono (HIRST; ROBSON, 2011). Já o envolvimento do NO na modulação da nocicepção é complexo. Vários estudos demonstram que o NO pode promover efeitos tanto pró quanto antinociceptivos dependendo do tipo e da fase do processo nociceptivo e também do tipo de estímulo utilizado (de origem mecânica ou térmica). Além disso, doadores ou inibidores de NO, dependendo da dose, podem causar nocicepção ou antinocicepção (CURY et al., 2011). Este duplo efeito ocorre a nível central e/ou periférico e muitos estudos foram realizados a fim de entender sua função dual.

Tem-se observado que dependendo do local de ativação, a via L-arginina/NO/cGMP poderia induzir efeitos opostos, isto é, nocicepção, ou antinocicepção. Em ratos, a administração intraplantar de fármacos capazes de ativar esta via, por exemplo, induz fenômenos nociceptivos, ao passo que a injeção subcutânea resulta em antinocicepção. Estes achados sugerem a existência de diferentes subconjuntos de neurônios sensoriais nociceptivos primários por meio dos quais o NO desempenha papéis opostos (VIVANCOS; PARADA; FERREIRA, 2003). Em geral se observa que tanto o excesso quanto a deficiência de NO parecem estar implicados em quadros de dor e inflamação (MICLESCU; GORDH, 2009), entretanto, na periferia, em diferentes abordagens experimentais, esta molécula é um mediador-chave de fenômenos nociceptivos (SCHMIDTKO; TEGEDER; GEISLINGER, 2009). Neste sentido, foi demonstrado recentemente que o pré-tratamento com L-NGNitroarginina Metil Ester (L-NAME, um inibidor não seletivo de NOS) atenua significativamente a hiperalgesia térmica no modelo de inflamação da pata induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA) em camundongos (CHEN et al., 2010).

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

## 2.6 Fototerapia

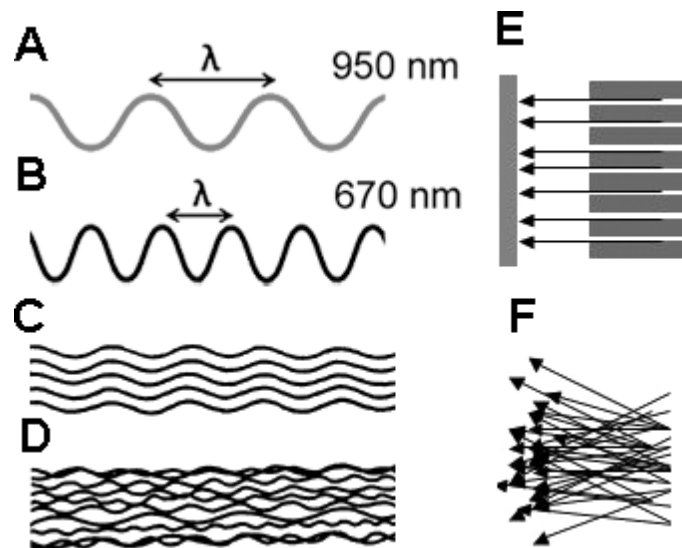
O emprego terapêutico da luz, conhecido como fototerapia, tem sido explorado há mais de mil anos no Egito antigo, Índia e China, para o tratamento de afecções cutâneas sob a luz solar (BAROLET, 2008). Em 1903, o dermatologista e pesquisador dinamarquês Nils Finsen ganhou o Prêmio Nobel de Medicina, utilizando doses concentradas de radiação UV (ultravioleta) para o tratamento do Lupus vulgaris.

Na década de 60, as suspeitas sobre o possível potencial cancerígeno do LASER foram descartadas dando lugar à consolidação do efeito bioestimulador da fototerapia, uma vez que emissão luminosa constante promoveu o crescimento do pelo de camundongos (MESTER; SZENDE; GARTNER, 1968). Tal fato estimulou outras pesquisas que culminaram na confirmação da eficácia da luz vermelha na cicatrização de feridas (BAROLET, 2008). Atualmente, a fototerapia é amplamente difundida, sendo um recurso utilizado na fisioterapia para fins estéticos, cicatriciais e para redução da dor. (MELIS; DI GIOSIA; ZAWAWI, 2012).

Primeiramente os efeitos biológicos da fototerapia foram explicados pela propriedade de coerência (comprimentos de onda em fase), (Figura 7) da luz emitida pelos LASERs (MESTER; MESTER; MESTER, 1985).

Entretanto, novos estudos indicaram que a coerência não desempenha um papel essencial no efeito biológico, pois tanto a luz coerente como a não-coerente, clinicamente, apresentam a mesma eficácia (KARU, 1987; PONTINEN; AALTOKALLIO; KOLARI, 1996) e quase que imediatamente após a transmissão da luz, a coerência na pele deixa de existir, basicamente devido à refração tecidual, característica dessa luz (AGNE, 2009; LOBKO; KARU; LETOKHOV, 1985; BASFORD, 1995; NUSSBAUM, 2003). Os diodos de LASER e LEDs diferem em alguns pontos importantes além da característica da coerência da

emissão da luz (Figura 7). LASERs são monocromáticos (único comprimento de onda), colimados (não-divergente) e coerentes, LEDs emitem luz quase monocromática, não colimada e não-coerente, em uma banda espectral muito estreita, entre 5 e 30 nm de largura, com picos de emissão que se ajustam precisamente aos picos de absorção dos cromóforos endógenos quando o comprimento de onda e a dose são corretamente selecionados (COSTA; CORRAL-BAQUES; AMAT, 2007). Assim, pode-se dizer que estas pesquisas impulsionaram a expansão da fototerapia com fontes emissoras de luz não coerentes como os diodos emissores de luz - LEDs.



**Figura 7 – Aspectos físicos da luz irradiada por LASERs e LEDs.**

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

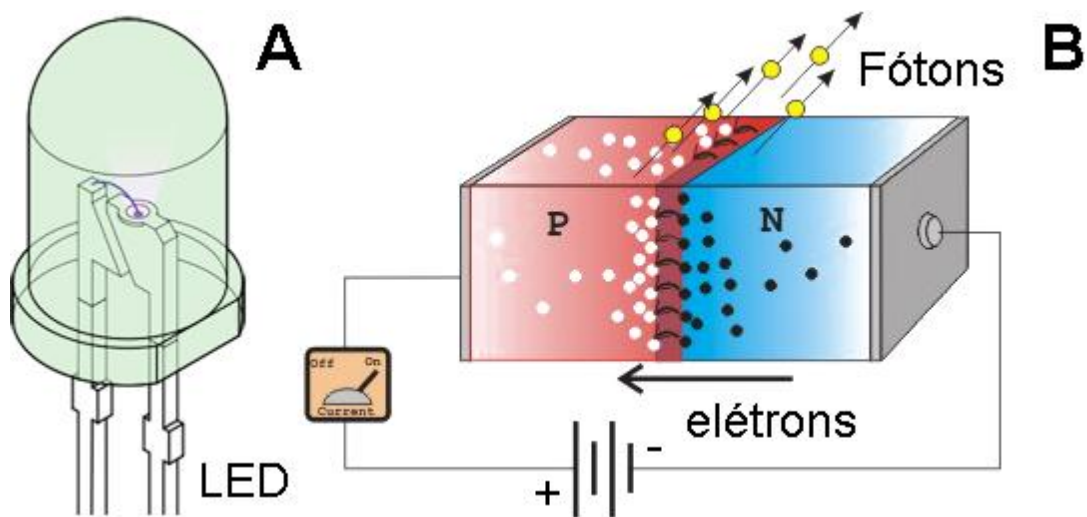
Fonte: Adaptado de Baxter (2003).

### 2.6.1 Terapia por diodo emissor de luz (LEDT)

A LEDT é um tipo de fototerapia que utiliza como fonte de radiação os LEDs (VINCK et al., 2005). LEDs são diodos semicondutores (junção P-N) que quando energizados emitem luz (SCHUBERT, 2006) (Figura 8). Além disso, os LEDs convertem a energia da

corrente elétrica em um espectro luminoso estreito não-coerente e não fornecem energia suficiente para causar danos teciduais, sendo aprovado pela FDA norte-americana (Food and Drug Administration) para uso em humanos.

Inicialmente as pesquisas sobre LEDT foram impulsionadas pelo interesse da NASA (do inglês, *National Aeronautics and Space Administration*) em estimular o crescimento de plantas em estações espaciais. Anos depois, os avanços científicos permitiram nortear o emprego do LEDT para cicatrização de tecidos e tratamento de lesões de tecidos moles (VINCK et al., 2005), tratamento do câncer de pele (BAROLET, 2008) e mais recentemente o tratamento da dor e condições inflamatórias (ABRAMOVITS; ARRAZOLA; GUPTA, 2005).



**Figura 8 – LED e Junção P-N.**

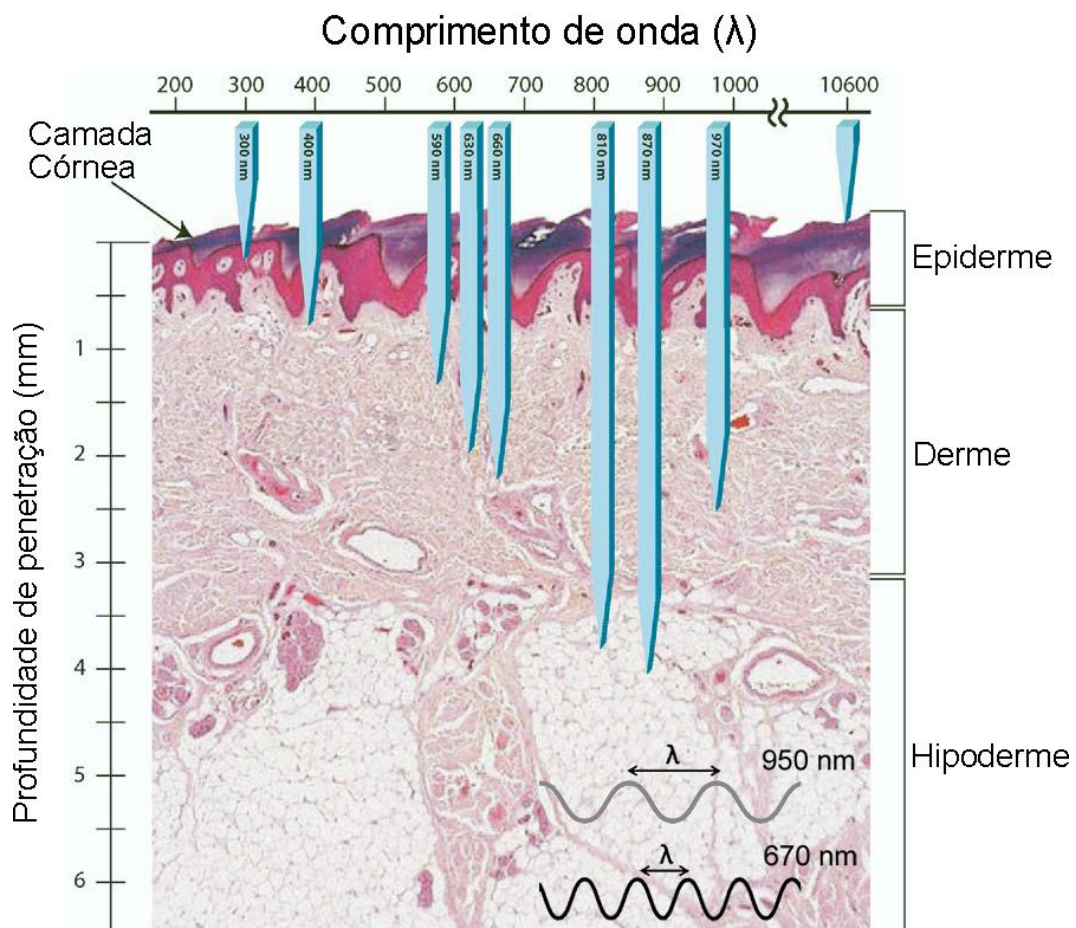
(A) LED; (B) Junção P-N: caracterizada pela junção de um semicondutor do tipo P (com cargas elétricas positivas) e de um semicondutor tipo N (com cargas elétricas negativas). A aplicação de tensão suficiente induz recombinações entre lacunas (P) e elétrons (N). Em cada recombinação um quantum de energia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

Fonte: Adaptado de Schubert (2006).

A LEDT é realizada na faixa de 600-1200 nm do espectro vermelho e infravermelho, considerada uma “janela terapêutica” (NIEMZ, 2007; BAROLET, 2008) (Figura 9), podendo estimular a proliferação de fibroblastos, a síntese de colágeno, promover angiogênese, estimular macrófagos e linfócitos por melhorar o metabolismo energético no interior da mitocôndria, além de promover a produção de fatores de crescimento (EELLS et al., 2004; DESMET et al., 2006). Sugere-se ainda, que na faixa espectral de 600-1200 nm, a LEDT altera a expressão de genes envolvidos na cicatrização de tecidos e reduz a transmissão

dolorosa (EELLS et al., 2004). Mais especificamente, o efeito analgésico da LEDT foi mostrado em estudos com pacientes com dor crônica severa de etiologias diversas (COSTA et al., 2008), com dor muscular induzida (VINCK et al., 2006), em casos de neuropatia periférica diabética (SWISLOCKI et al., 2010), no tratamento da hipersensibilidade dentária (LIZARELLI et al., 2010), mucosite oral e dor bucal (WHELAN et al., 2002; RIMULO et al., 2011; HODGSON et al., 2012). Em estudos com animais, a LEDT reduziu a mucosite induzida pela quimioterapia em hamsters (SACONO et al., 2008).

A LEDT com comprimento de onda de 625 a 940 nm, também produz efeitos importantes atividades biológicas, como síntese de ATP, redução de edema e migração de células inflamatórias, diminuição da produção de citocinas e mediadores inflamatórios (CORAZZA et al., 2007; SERAFIM et al., 2012).



**Figura 9 – Profundidade de penetração na pele para diferentes comprimentos de onda ( $\lambda$ ).**

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

Fonte: Adaptado de Barolet (2008).

Estudos demonstraram que a incidência da luz de LEDs no espectro visível (vermelho) sobre o tecido estimula a liberação de substâncias vasodilatadoras, como histamina e óxido nítrico, facilitando a drenagem da área inflamada, bem como a ativação da enzima superóxido dismutase, que controla a ação dos superóxidos, estabiliza o pH, diminui a adesão plaquetária e estimula a microcirculação (ASSIS et al., 2012; ANDRADE-NADUR et al., 2014). A estabilização do meio extracelular induzida pela radiação da luz contribui para a permeabilidade da membrana celular, proporcionando ao tecido lesionado condições de autorregeneração, acelerando etapas da inflamação e minimizando o uso de medicamentos (ERDLE et al., 2008; LIM et al., 2007; TRELLES; ALLONES, 2006). Do mesmo modo, a inibição da síntese de prostaglandinas E2 (PGE2) e a hipoatividade da enzima ciclooxigenase (COX), reforçando, assim o potencial anti-inflamatório da LEDT (WONG-RILEY, 2005; MORAIS, 2010).

Foi demonstrado que a LEDT apresenta atividades anti-inflamatórias no tratamento clínico de acnes (GOLDBERG; RUSSELL, 2006; FIORIO et al., 2011; WHEELAND; DHAWAN, 2011; KWON et al., 2012), sendo amplamente utilizada em dermatologia para tal fim. Além disso, o tratamento com a LEDT foi eficaz em modelos experimentais de periodontite (CHANG et al., 2012; FONSECA et al., 2013), na lesão muscular induzida por exercício intenso (CAMARGO et al., 2012), na lesão do tendão de Aquiles (XAVIER et al., 2010), no modelo de transecção do ligamento cruzado anterior (OSHIMA et al., 2011) e na lesão do nervo isquiático (SERAFIM et al., 2012; PIGATTO et al., 2013), bem como em modelos de inflamação in vitro (CHOI et al., 2012; KWON et al., 2012).

## 2.6.2 Parâmetros utilizados na fototerapia

Em fototerapia o conhecimento dos vários parâmetros envolvidos na dosimetria é essencial para determinar a quantidade de energia necessária para o tratamento (MEINHARDT et al., 2008; ENWEMEKA, 2009).

- Comprimento de onda ( $\lambda$ ): A distância entre duas cristas de onda. Quanto menor o comprimento de onda, maior a frequência de vibração da partícula de luz, e como regra geral, maior a profundidade de penetração de seu feixe nos tecidos.
- Energia radiante (Q): Medida da energia da radiação eletromagnética, expressa em joules (J).

- Potência radiante ( $\Phi$ ): É definida como a taxa na qual a energia é gasta, medida em watts (W). É calculada, dividindo a energia medida em joules (J) pelo tempo medido em segundos (s):  $\text{Potência (W)} = \text{Energia (J)} / \text{Tempo (s)}$ .
- Área do feixe luminoso (a): Define a área coberta pelo feixe, quer na ponta do aplicador, quer em qualquer distância dada além desse ponto. Na ponta do aplicador, a área do feixe luminoso é essencialmente o mesmo que a área efetiva da fonte, portanto, quando o aplicador é colocado em contato direto com a pele do paciente, pode-se dizer que ambos são intercambiáveis,
- Densidade de potência ou irradiância (Ee): Energia emitida pelo feixe de luz por unidade de área. É definida como a razão da potência sobre a área da superfície irradiada. A densidade de potência é medida em watts por centímetro quadrado ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ).  $\text{Densidade de potência (W}/\text{cm}^2) = \text{Potência (W)} / \text{Área (cm}^2)$ .
- Densidade de energia ou fluência (H): Definida como a quantidade de energia fornecida por unidade de área, expressa como a dose na prática clínica. É expressa em joules (J) e calculada, multiplicando a potência pelo tempo dividido pela área.  $\text{Densidade de energia (H)} = \text{Potência (W)} \times \text{Tempo (S)} / \text{Área (cm}^2)$ .

### 2.6.3 Mecanismo de ação da fototerapia

Até o início da década de 80, os mecanismos da radiação eletromagnética em nível molecular e celular eram desconhecidos. Trabalhos científicos realizados ao longo desse período estabeleceram as bases para a compreensão dos mecanismos moleculares associados aos efeitos da luz sobre as células (KARU, 1987). Descobriu-se que a resposta celular à fotoestimulação não está associada a propriedades específicas da luz, como a coerência, ampliando o uso de fontes emissoras de luz não coerente como os LEDs, já que são dispositivos mais baratos, de maior facilidade de manuseio e operam com correntes elétricas baixas em comparação aos LASERs (SCHUBERT, 2006).

Ao incidir um feixe de luz em uma superfície se produz uma reflexão que varia segundo o ângulo de incidência bem como as características ópticas da superfície (AGNE, 2009). A parcela restante da radiação luminosa é absorvida por moléculas fotoceptoras ou fotorreceptoras, capazes de serem excitadas pelos fótons incidentes em decorrência de suas



configurações eletrônicas ou atômicas. Dentre as moléculas capazes de absorver com os fótons estão os cromóforos. Os aminoácidos e ácidos nucleicos apresentam absorção significativa no espectro ultravioleta (BAXTER, 1995), os cromóforos, por sua vez, absorvem luz no espectro visível, sendo a hemoglobina e a melanina os mais comuns (BAXTER, 2003; NUSSBAUM, 2003), além de alguns componentes da cadeia respiratória, sobretudo a citocromo c oxidase, que absorve tanto a radiação no espectro visível quanto no infravermelho (KARU, 1999).

Os exatos mecanismos de ação da fototerapia ainda não estão completamente elucidados (BAROLET, 2008), porém, atualmente algumas hipóteses são discutidas.

A hipótese mais aceita é a de que a interação entre a molécula fotoceptora e o feixe luminoso resulta na aceleração da transferência de elétrons na cadeia respiratória da mitocôndria e produção de radicais livres por meio de uma mudança nas propriedades de oxirredução dos transportadores (KARU, 2010).

Evidências sugerem que a fotobiomodulação envolve a estimulação do metabolismo da energia celular e produção de energia mediada por ação das mitocôndrias como o fotorreceptor celular primário ou alvo para a absorção dos fótons. Na mitocôndria, o complexo IV da cadeia respiratória (citocromo c oxidase) se constitui no principal cromóforo que absorve a luz incidente, embora outros citocromos, porfirinas, e proteínas heme possam estar envolvidos. Os componentes de cobre do complexo IV da cadeia respiratória, CuA e CuB, são considerados como fotoceptores, podendo ser oxidados ou reduzidos e assim aumentar a taxa de transferência de elétrons da citocromo c oxidase (KARU, 1999). A excitação da molécula fotoceptora parece estimular o metabolismo celular através de cascatas de reações de sinalização celular ou sinalização mitocondrial retrógrada. A sinalização retrógrada seria oposta ao caminho comum levando informações do núcleo e do citoplasma para a mitocôndria. Neste caso, a sinalização retrógrada envia informações de volta ao núcleo sobre mudanças no estado funcional da mitocôndria (KARU, 2008). Uma destas cascatas envolve a dissociação do óxido nítrico do centro catalítico da citocromo c oxidase onde age como um inibidor. Quando a atividade da enzima é reduzida pela radiação com a luz, o óxido nítrico dissocia-se do centro catalítico, e esse evento poderia transitoriamente diminuir essa inibição (KARU, 2010).

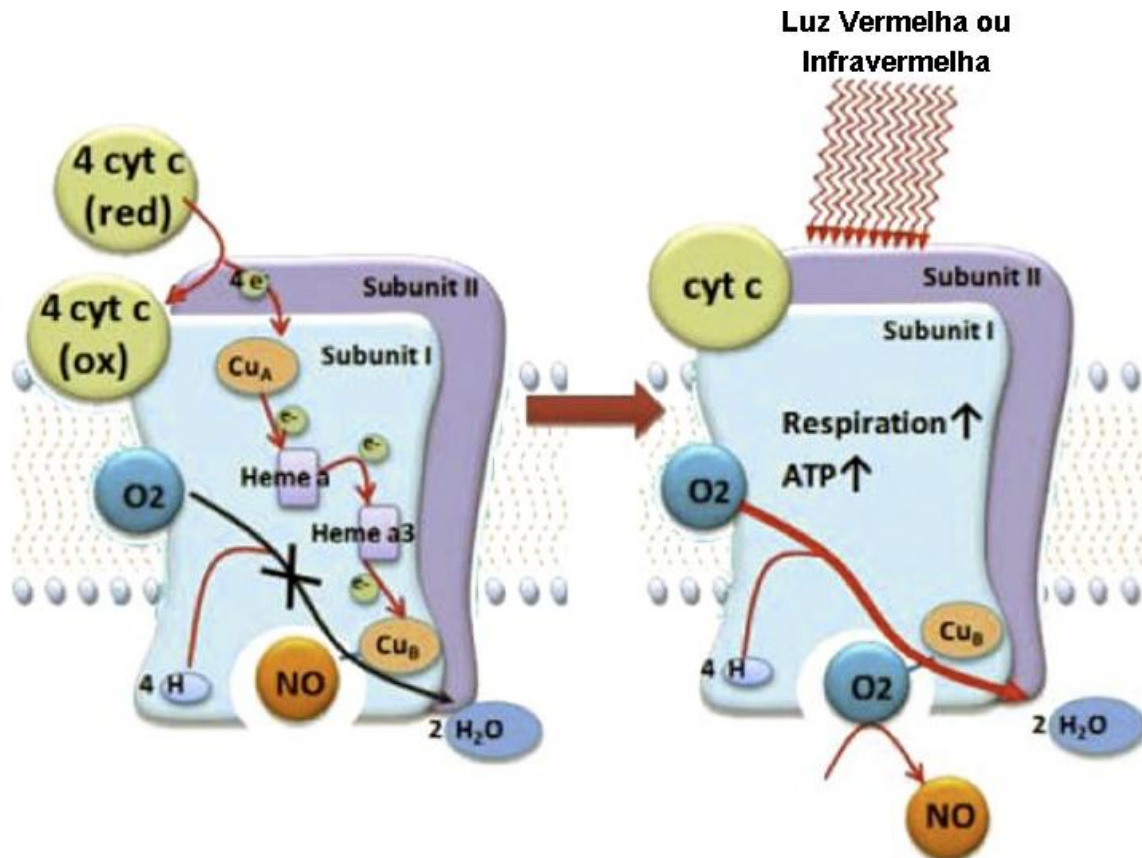
Outra via de sinalização, a partir da mitocôndria está relacionada ao aumento nas concentrações de ATP no tecido irradiado. O aumento da produção de ATP em mitocôndrias isoladas, por exemplo, de músculos esqueléticos, após irradiação com diferentes comprimentos de onda foi demonstrado por vários pesquisadores (YU et al., 1997; TAFUR

et al., 2008; GAO e XING, 2009). O ATP, a moeda energética celular, é essencial para a homeostasia celular, e sabe-se que pequenas mudanças nas concentrações de ATP podem resultar em alterações significativas no metabolismo celular (BARATTO e cols., 2010). Desta forma, a absorção de luz leva ao aumento da cadeia de transporte de elétrons e assim, o aumento da atividade do citocromo c oxidase e da síntese de ATP (KARU; PYATIBRAT; AFANASYEVA, 2005, 2008).

Ainda, há evidências demonstrando que a radiação de luz reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que ocorre durante a fase aguda de lesão epitelial. Isso se deve principalmente por acelerar o processo inflamatório e assim diminui a exposição celular a ERO (FITZGERALD et al., 2010).

Outra característica é a diminuição da ativação do fator de transcrição nuclear kappa  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) e citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 Beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) como também aumento na interleucina 10 (IL-10) que é anti-inflamatória (PIRES et al., 2012; BASSO et al., 2012). Por outro lado, os efeitos anti-inflamatórios exercidos pela terapia fotônica parecem ocorrer através de aceleração de microcirculação resultando em mudanças na pressão hidrostática capilar com reabsorção do edema e eliminação do acúmulo de metabólitos intermediários da inflamação (DA SILVA et al., 2010). Assim, as alterações em moléculas sinalizadoras intracelulares, tais como íons cálcio, EROs e fatores de transcrição redox sensíveis como o NF- $\kappa\beta$  também estão envolvidos nos efeitos da luz (SHARMA et al., 2011).

Nesse sentido, estudos que envolvam mecanismos de ação os quais estão envolvidos no efeito analgésico da LEDT tornam-se uma ferramenta importante para o alívio dos processos dolorosos envolvidos em diferentes patologias.



**Figura 10 – Papel do óxido nítrico na fototerapia**

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

Fonte: Hashmi et al., (2010).

### **3 JUSTIFICATIVA**

Segundo dados da Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED), a dor afeta pelo menos 30% dos indivíduos durante algum momento da sua vida e, em torno de 10 a 40% destes episódios têm duração superior a um dia. No Brasil 30% da população sofre de algum tipo de dor, o que corresponde a cerca de 60 milhões de brasileiros.

Várias pesquisas em todo o mundo têm sido realizadas na busca por terapias eficazes e seguras para o controle da dor. Atualmente ainda não dispomos de medicamentos ou outros tratamentos que possam efetivamente aliviar a dor aguda com a velocidade ou a eficiência necessária para a maioria dos pacientes, sem que, no entanto, causem efeitos colaterais significativos que comprometam sua utilização.

Estudos recentes demonstraram que a LEDT apresenta atividade analgésica em vários modelos de dor de diferentes etiologias, entretanto, há uma carência de estudos pré-clínicos que fornecem o aporte científico para a atividade analgésica da LEDT na dor de diferentes etiologias, e em especial, na dor aguda e que enfoquem seus possíveis mecanismos fotobiológicos.

É importante ressaltar que a LEDT vem sendo empregada no tratamento da dor em milhares de pessoas em todo o mundo. O incremento na utilização dessa terapia deve, entretanto, ser fundamentado em estudos sobre sua eficácia e segurança. De fato, em fototerapia há uma série de indicações sem fundamentação científica, além de estudos com resultados conflitantes, em especial devido a relatos imprecisos dos parâmetros terapêuticos e da dosimetria empregada. Desta forma, justifica-se o estudo de terapias integrativas que possam complementar de forma segura e eficaz o tratamento da dor, bem como a importância de investigações científicas adequadas sobre os possíveis efeitos fisiológicos específicos que justifiquem ou não a utilização desta técnica terapêutica na clínica. Devidamente fundamentada, a LEDT pode ser uma importante ferramenta complementar no tratamento de quadros álgicos, em especial por ser uma terapia segura, não invasiva, com poucos efeitos adversos e de baixo custo.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

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

### **4.2 Objetivos específicos**

- 1) Avaliar a atividade antinociceptiva aguda da LEDT;
- 2) Verificar o efeito anti-inflamatório (antiedematogênico) da LEDT em modelos agudos de nocicepção;
- 3) Avaliar o decurso temporal do efeito antinociceptivo da LEDT;
- 4) Verificar o envolvimento de canais TRP e ASIC no efeito antinociceptivo da LEDT;
- 5) Investigar o envolvimento da LEDT na modulação de vias dependentes de PKA e PKC como mecanismo de seu efeito antinociceptivo;
- 6) Avaliar o efeito da LEDT na nocicepção induzida por um estímulo térmico;
- 7) Analisar o envolvimento de fibras C na atividade antinociceptiva da LEDT;
- 8) Investigar o envolvimento do sistema opioide, adenosinérgico e da via L-arginina/óxido nítrico no efeito antinociceptivo da LEDT.

## **5 ARTIGO CIENTÍFICO**

Alguns dos resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, o qual encontram-se aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontra-se no próprio artigo. O artigo está disposto da mesma forma que foi submetido à revista científica “PAIN”. Os demais resultados experimentais encontram-se em sequência do artigo.

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.

Glauce Regina Pigatto <sup>1,3</sup>, Igor Santos Coelho <sup>3</sup>, Rosane Schenkel Aquino <sup>3</sup>, Liliane Freitas Bauermann <sup>1,2</sup>, and Adair Roberto Soares Santos <sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Graduate Program in Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi, Santa Maria 97105-900, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi, Santa Maria 97105-900, RS, Brazil.

<sup>3</sup> Laboratory of Neurobiology of Pain and Inflammation, Department of Physiological Sciences, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Trindade, Florianopolis 88040-900, SC, Brazil.

Number of text pages: 38  
Number of figures: 8  
Number of tables: 1

# Corresponding author: Tel: +55 48 3721 4685; fax +55 48 37219672; E-mail address: [adair.santos@ufsc.br](mailto:adair.santos@ufsc.br) or [adairrs.santos@gmail.com](mailto:adairrs.santos@gmail.com) (A.R.S Santos).

## **Abstract**

Low-intensity phototherapy using light fonts, like LED (Light Emitting Diode), in the red to infrared spectrum are a promising alternative for the treatment of pain. LED phototherapy also accelerates wound healing and nerve regeneration. However, the underlying mechanisms by which LED phototherapy reduces acute pain are not yet well understood. Therefore, this

study investigated the analgesic effect of multisource LED phototherapy on the acute nocifensive behavior of mice induced by thermal and chemical noxious stimuli. The involvement of central afferent C-fibers sensitive to capsaicin in this effect was also investigated. Mice exposed to multisource LED (output power 290, 390 or 780 mW, from 10 to 30 min of stimulation) showed rapid and significant reductions in formalin- and acetic acid-induced nocifensive behavior. This effect gradually reduced but remained significant for up to 7 hours after LED treatment in the last model used. Moreover, LED (390 mW/ 20 min) irradiation also reduced nocifensive behavior in mice due to chemical [endogenous (i.e., glutamate, prostaglandins and bradykinin) or exogenous (i.e., formalin, acetic acid, TRPs and ASIC agonist, and protein kinase A and C activators)] and thermal (hot plate test) stimuli. Finally, ablating central afferent C-fibers abolished LED analgesia. These findings provide new evidence indicating that LED phototherapy reduces the acute painful behavior of animals caused by chemical and thermal stimuli and that LED analgesia depends on the integrity of central afferent C-fibers sensitive to capsaicin. Thus, LED phototherapy may be an important tool for the management of acute pain.

**Keyword:** Light Emitting Diode, phototherapy, acute pain, chemical and thermal stimuli, analgesia.

## 1. Introduction

Recent technological advances have refined the clinical assessment and management of patients in the acute care setting. According to the WHO, access to essential medicines and health technologies is one of the cornerstones of the Universal Health Coverage initiative [72]. Medical devices, assistive devices and eHealth solutions are important components of health technology, which may save lives and improve quality of life and well-being. However, many people worldwide suffer due to a lack of access to high-quality and



affordable health technology, especially in low- and middle-income countries [72]. Moreover, new technologies and a multidisciplinary approach aid the proper management of pain to alleviate suffering and improve the quality of life of people living with pain [11, 33, 72]. Notably, patients commonly seek healthcare and are admitted to hospitals due to acute pain [9, 72]. Acute pain also constitutes an important warning sign of disease or injury and consequently requires further analysis. Pain arises from the activation of the high-threshold primary sensory nerve fibers called nociceptors (A $\delta$  and C fibers) at the site of tissue damage and is generally associated with surgery, trauma, inflammatory processes or acute illness as a consequence of an adverse chemical, thermal, or mechanical stimulus [3, 6, 8, 40]. Although pain in response to tissue damage is a normal phenomenon, it may be associated with significant, unnecessary physical, psychological, and emotional distress [26, 42, 45]. In addition, pain is a frequent "chief complaint" for adults presenting to emergency departments (EDs), and 45% of patients in the ED reported their pain as moderate to severe [11, 33]. Inadequately controlled acute pain can be a factor in the development of chronic pain [3, 6, 8, 18], extended hospital stays, readmission, and patient dissatisfaction [29, 61]. Despite the recognition of the widespread prevalence of pain and increased efforts to promote effective pain management, pain remains inconsistently and inadequately addressed [28, 72, 73].

Low-intensity phototherapy is a promising alternative for the treatment of pain. This approach promotes photobiomodulation, a process in which an irradiated light in the red to near-infrared region of the light spectrum (630–1000 nm) modulates numerous cellular functions [1, 4, 34]. LED phototherapy is a recent category of phototherapy and has been shown to accelerate wound healing and reduce pain in a large variety of acute and chronic pain entities, including pain related to abnormalities in nerves, soft tissue, muscles, tendons, joints and bone [4, 13, 14, 19, 20, 23, 31, 35, 41, 49, 53, 60, 66, 67, 69, 70, 71]. However, the mechanism underlying this effect is poorly understood. Here, we demonstrate the effect of

different doses of LED phototherapy on the acute nocifensive behavior of mice induced by endogenous and exogenous chemical noxious stimuli, as well as the effect of the most effective dose of LED phototherapy for nocifensive behavior induced by thermal stimuli. We also evaluated the effect of LED phototherapy on nociception due to protein kinase C and adenylyl cyclase activators. Finally, we investigated the involvement of capsaicin-sensitive fibers in this analgesic effect.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Animals*

A total of 521 2-month-old (25–35 g) female Swiss mice obtained from the animal facility of the Federal University of de Santa Catarina (Florianópolis, SC, Brazil) were housed in groups of 5 per cage at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and 60–80% humidity under a 12-h light/dark cycle (lights on at 06:00 h), with ad libitum access to standard laboratory diet and water. The animals were habituated to laboratory conditions for at least 1 h before testing, and all experiments were performed during the light phase of the cycle. The animals were randomly distributed between the experimental groups (6–12 animals per group), and the experimental procedures and protocols reported in this study were previously approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Catarina (protocol number PP00745), where the study was conducted. Furthermore, all experiments were conducted in accordance with ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain [75] and with Brazilian national legislation. The number of animals used and the intensity of the noxious stimuli were the minimum necessary to obtain reliable data. Each animal was used only once and was euthanized by cervical dislocation immediately after the completion of the experiment.

## 2.2 Chemical reagents

The following substances were used: formalin (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), acetic acid (Merck, Darmsted, Germany), L-glutamic acid hydrochloride (glutamate), capsaicin, cinnamaldehyde, prostaglandin E2, Bradykinin, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), menthol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), forskolin (Tocris Bioscience, Missouri, EUA), and ethanol (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil). All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers. The following agents were immediately dissolved in 0.9% NaCl solution before administration: capsaicin (diluted in 10% ethanol/10% Tween 80), menthol (diluted in 1.6% ethanol/0.01% Tween 80) and glutamate (diluted in saline and neutralized with 3 M NaOH). The final concentration of Tween 80 or ethanol did not exert an effect when administered alone.

## 2.3 Light-emitting diode phototherapy

An Anodyne® multisource LED device (Anodyne® Therapy System, Model 480, FL, USA) was used in the experiments, which delivers radiant power at 6.24 W (34.7 mW/cm<sup>2</sup>) with 8 flexible therapeutic pads. Each pad emits 780 mW of light energy at a wavelength of 890 nm (it contains 60 superluminous gallium-aluminum-arsenide diodes, 13 mW of energy output per diode in 3 × 7.5 cm, or 22.5 cm<sup>2</sup> per pad). One therapeutic pad was used per animal in this study. The pad light-emitting diode was positioned below the acrylic testing platform (10 × 4.5 × 4 cm), and infrared radiation was directly applied to the ventral side of the animal. The mice were subjected to habituation for 10 min on the acrylic testing platform in the absence of the therapeutic pad; the mice were protected by a thin plastic wrapper that prevented the contact of urine or feces with the lights. The physicals parameters of the output of this unit, which correspond to the dosage used, are presented in Table 1.

## 2.4 Experimental design

Initially, the animals were submitted to multisource LED phototherapy as described above. The first experiment sought to establish the temporal profile and optimum analgesic dose of multisource LED phototherapy (output power in mW). In this experiment, mice were subjected to LED radiation at an output power of 234 mW (power density  $10.4 \text{ mW/cm}^2$ ), 390 mW (power density  $17.3 \text{ mW/cm}^2$ ) and 780 mW (power density  $34.6 \text{ mW/cm}^2$ ) for four different time periods of stimulation (0, 10, 20 and 30 min of duration). Subsequently, formalin-induced nociception was evaluated as described in Fig. 1. Additionally, the LED device was turned off for the same time periods to assess the analgesic effect of restraint (control group). Subsequent experiments were conducted to extend the observations from experiment 1 and assess the ability of LED phototherapy to inhibit visceral nociception caused by acetic acid. In this experiment, mice were subjected to the LED device at output powers of 234 mW (Energy density  $10.4 \text{ J/cm}^2$ ), 390 mW (Energy density  $20.8 \text{ J/cm}^2$ ) and 780 mW (Energy density  $31.2 \text{ J/cm}^2$ ) for 20 min (this time was selected because it yielded the best analgesic efficacy in Experiment 1). Nociception induced by acetic acid was then evaluated (Fig. 1). In another group of experiments, mice were subjected to the LED device at a power of 390 mW (Energy density  $20.8 \text{ J/cm}^2$ ) for 20 min immediately before treatment (0 h) and after treatment (0.5, 1, 2, 4, 6, 7 and 8 h) to verify the time-course of the analgesic effect of LED phototherapy in the acetic acid test.

Furthermore, the effect of LED phototherapy on primary afferent (sensory) neurons and processing nociception was investigated. To this end, mice were subjected to the LED device (output power 390 mW, Energy density  $20.8 \text{ J/cm}^2$ ) for 20 min because this stimulation period yielded the best analgesic effect in response to formalin- and acetic acid-induced nociception. Animals treated with a turned-off LED device were used as a control group. First, we investigated the ability of LED phototherapy to reduce nociception caused by

endogenous mediators, such as glutamate, prostaglandin E2 and bradykinin, which are produced during tissue injury (Fig. 1). Second, we examined the effects of LED therapy on nociception caused by exogenous noxious chemicals that are activators of transient receptor potential (TRP) channels and acid-sensing ion channels (ASICs), which are important chemosensors responsible for the detection of noxious stimuli (Fig. 1). Third, we also evaluated the effect of LED therapy on nociception caused by activators of protein kinase C (PKC) and adenylyl cyclase (AC), which are intracellular messengers that play an important role in the induction and maintenance of pain. Fourth, we investigated the effect of LED phototherapy on the pain behavioral reflex evoked by noxious heat stimuli in a hot plate test. Finally, we investigated the involvement of capsaicin-sensitive fibers in the analgesic effect of LED phototherapy on nociception caused by formalin (Fig. 1).

## *2.5 Behavioral tests*

### *2.5.1 Formalin test*

The procedure used was similar to that described previously [62]. After an adaptation period and treatment, mice received 20  $\mu$ l of a 2.5% formalin solution (0.92% formaldehyde) in saline via an intraplantar injection into the ventral surface of the right hind paw. After the formalin injection, the animals were immediately individually placed in an acrylic chamber, and the time spent licking the injected paw was recorded with a chronometer for both the early neurogenic phase (0–5 min) and late inflammatory phase (15–30 min) of this model. These values were considered measures of nociception. Paw edema was measured before and after the injection of formalin using digital micrometer (MT-045B; Shangai Metal Great Tools Co., Shangai, China) and was expressed as the difference between paw thickness before and after formalin challenge ( $\Delta$  paw thickness, in millimeters).

### 2.5.2 Acetic acid test

Abdominal constriction was induced according to procedures described previously [62] and resulted in a contraction of the abdominal muscle together with a stretching of the hind limbs in response to an intraperitoneal injection of acetic acid (0.6%, 0.45 ml/mouse) at the time of the test. After the irritant injection, the mice were individually placed in an acrylic chamber, and the abdominal constrictions were counted cumulatively over a period of 20 min. These values were considered measures of nociception.

### 2.5.3 Nocifensive behavior induced by endogenous chemical mediators

The procedure used was similar to that described previously [15, 46]. After an adaptation period and treatment, mice received a 20  $\mu$ l intraplantar injection of bradykinin (3 nmol/paw), prostaglandin E2 (3 nmol/paw) or glutamate (20  $\mu$ mol/paw, pH 7.0) in the ventral surface of the right hind paw. Immediately after the injection, each animal was individually placed into an acrylic chamber, and paw licking or biting was recorded with a chronometer for 15 min. This behavior was considered indicative of nociception.

### 2.5.4 Nocifensive behavior induced by noxious chemicals that activate transient receptor potential (TRP) channels and acid-sensing ion channels (ASICs)

The procedure used was similar to that described previously [15, 63]. After an adaptation period and treatment, mice received a 20  $\mu$ l intraplantar injection of either capsaicin (an activator of the TRPV1 channel, 5.2 nmol/paw), cinnamaldehyde (an activator of the TRPA1 channel, 10 nmol/paw), menthol (an activator of the TRPM8 channel, 1.2  $\mu$ mol/paw) or acidified saline (2% acetic acid in 0.9% saline, pH 5.0) into the ventral surface of the right hind paw. The animals were individually placed in an acrylic chamber, and paw licking or biting was recorded with a chronometer for 5 min (capsaicin and cinnamaldehyde),

15 min (acidified saline) or 20 min (menthol). The amount of time spent licking/biting the injected paw was considered indicative of nociception.

#### *2.5.5 Nocifensive behavior induced by noxious chemicals that activate protein kinase C (PKC) and adenylyl cyclase (AC)*

The procedure used was similar to that described previously [2, 50]. After an adaptation period and treatment, the mice received 20  $\mu$ l intraplantar injections of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, an activator of PKC, 50 nmol/paw) or forskolin (an activator of AC, 50 nmol/paw) into the ventral surface of the right hind paw. Animals were individually placed in an acrylic chamber, and paw licking or biting was recorded with a chronometer for 30 min (15 to 30 min after the injection of PMA) or 10 min (forskolin). The amount of time spent licking/biting the injected paw was considered indicative of nociception.

#### *2.5.6 Hot plate test*

The hot plate test was used to measure the response latencies according to a previously described method [25]. In these experiments, a hot plate (AVS Projetos, Campinas, SP, Brazil) was maintained at  $50 \pm 1^\circ\text{C}$ . The animals were placed in clear plastic chambers on the surface of the apparatus and the time (s) between placement and the shaking or licking of paws or jumping was recorded as the index of response latency. Animals that remained on the apparatus for an average of 16 s had been selected 24 h before the test based on their reactivity in the model. A latency period (cut-off) of 30 s was defined as complete analgesia. To determine the baseline, each animal was tested before treatment with LED irradiation using the same heat stimulus. The MPE of LED-induced analgesia was calculated as follows:

$$\%MPE = [(post-LED - pre-LED)/(30 - pre-LED)] \times 100.$$

### *2.5.7 Involvement of the central afferent fibers sensitive to capsaicin*

To explore the role of the central afferent fibers sensitive to capsaicin in the analgesic effect of LED phototherapy, the mice were anesthetized with 1-2 % isoflurane and intrathecally treated with capsaicin (10 µg/site, i.t.; in a volume of 5.0 µl with a 30 gauge needle attached to a Hamilton syringe) as described previously [10] with minor modifications. Control animals received the same volume of vehicle used to dissolve capsaicin (10% ethanol, 10% Tween 80, and 80% saline) via the same route. Following 24 h treatment with capsaicin or vehicle, the animals were treated with LED irradiation. Nocifensive behavior was then induced by formalin and analyzed as described above. The efficiency of the ablation of the central afferent fibers sensitive to capsaicin was confirmed based on the paw withdrawal latency in the hot-plate test (50 °C), as described above.

### *2.6 Statistical analysis*

Results are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.) of 8-10 mice per group. The results were statistically analyzed using an unpaired Student's t test, and a one-way or two-way ANOVA, if the Student-Newman-Keuls or Bonferroni tests was used for multiple comparisons, respectively. In all cases, differences were considered significant when  $P < 0.05$ . The statistical analysis was performed using the GraphPad Software (San Diego, CA, USA).

## **3. Results**

### *3.1 LED phototherapy reduces the nocifensive behavior and paw edema induced by formalin*

To test the ability of LED phototherapy to reduce pain behaviors, we tested a series of pain behaviors in animals induced by different noxious chemicals. Initial studies were based



on the formalin test, which is a widely used model of persistent pain and is a mainstay for the development of novel agents for the treatment of acute and chronic pain [5, 22, 38, 68].

The intraplantar injection of formalin resulted in a typical biphasic nocifensive behavior. Mice spent approximately 80 s and 300 s displaying nociceptive behaviors during the first 5 min (neurogenic pain, phase 1) and the subsequent 15–30 min (inflammatory pain, phase 2) of the assay, respectively (Fig. 2 A and B). In addition, formalin induced marked paw edema (~1 mm thick), which is associated with release of inflammatory mediators in phase 2 of this model (Fig. 2 C). A single treatment with LED at an output power of 390 mW (Energy density 20.8 J/cm<sup>2</sup>) and 780 mW (Energy density 31.2 J/cm<sup>2</sup>) but not 234 mW (Energy density 10.4 J/cm<sup>2</sup>) for 20 min significantly reduced both the neurogenic and inflammatory phases of formalin-induced nocifensive behavior compared with the control group. Specifically, this inhibition ranged from 27 ± 2% to 45 ± 3% (Fig. 2A, B, D and E). In addition, the nocifensive behavior in phase 2 of the formalin test was only inhibited by treating animals with LED irradiation at an output power of 390 mW (Energy density 41.6 J/cm<sup>2</sup>) for 30 min (Fig. 2B). Furthermore, phase 1 was inhibited by LED irradiation at output powers of 390 mW (Energy density 41.6 J/cm<sup>2</sup>) and 780 mW (Energy density 62.4 J/cm<sup>2</sup>) for 30 min (Fig. 2A). As illustrated in Figure 2C, a single treatment with LED irradiation at an output power of 390 mW (Energy density 20.8 J/cm<sup>2</sup>), but not 234 mW (Energy density 10.4 J/cm<sup>2</sup>) or 780 mW (Energy density 31.2 J/cm<sup>2</sup>), for 20 min significantly reduced paw edema caused by formalin. Nevertheless, an output power of 780 mW (Energy density 31.2 J/cm<sup>2</sup>) non-significantly reduced the edema caused by formalin (Fig. 2C).

### *3.2 LED phototherapy reduces the nocifensive behavior induced by acetic acid*

The acetic acid-induced writhing reaction in mice is typically used as a model of inflammatory visceral pain and has been widely used to evaluate the analgesic or anti-

inflammatory properties of new agents [5, 38]. Confirming the data obtained in the formalin test, a single treatment with LED irradiation at an output power of 234 mW (Energy density 10.4 J/cm<sup>2</sup>), 390 mW (Energy density 20.8 J/cm<sup>2</sup>) and 780 mW (Energy density 31.2 J/cm<sup>2</sup>) for 20 min produced a marked reduction of acetic acid-induced abdominal constrictions, with inhibitions of 37 ± 10%, 66 ± 9% and 61 ± 9%, respectively (Fig. 3A). A time-course analysis of the analgesic effect of LED irradiation at 390 mW (Energy density 20.8 J/cm<sup>2</sup>) for a 20 min stimulation period is shown in Fig. 3B. Acute treatment with LED irradiation markedly inhibited nociception as early as 0 min after treatment, and this effect was gradually (inhibition of 66 ± 8% to 29 ± 4%) reduced but remained significant up to 7 h after LED treatment (Fig. 3B). Thus, the time point (0 to 0.5 h) at which the effect of LED phototherapy was maximized was selected for all further studies of independent groups of animals.

### *3.3 LED phototherapy reduces nocifensive behavior induced by endogenous mediators*

A considerable number of studies have suggested that nocifensive behavior caused by either formalin or acetic acid depends, at least in part, on the release of endogenous inflammatory mediators because several factors, such as bradykinin, prostanoids (e.g., prostaglandin E2), and glutamate, stimulate primary afferent nociceptors to cause nocifensive behavior [5, 6, 21, 38, 55, 68]. Here, we confirmed these findings and demonstrated that an intraplantar injection of bradykinin (3 nmol/paw), prostaglandin E2 (3 nmol/paw) or glutamate (20 μmol/paw, pH 7.0) elicited marked nocifensive behavior in mice (Fig. 4A–C). Treating animals with LED irradiation at an output power of 390 mW (Energy density 20.8 J/cm<sup>2</sup>) for 20 min significantly reduced the nociceptive responses induced by an intraplantar injection of bradykinin, prostaglandin E2 and glutamate compared with control group, with inhibitions of 40 ± 14%, 47 ± 10%, and 33 ± 4%, respectively (Fig. 4A-C).

### *3.4 LED phototherapy reduces nocifensive behavior induced by noxious chemicals that activate transient receptor potential (TRP) channels and acid-sensing ion channels (ASICs)*

Polymodal nociceptors are sensory neurons that detect aversive stimuli that are generally perceived as painful. Specifically, they respond to harsh touch, extremes of cold and heat, acidic pH and a variety of toxic chemicals [6, 27, 40, 52]. In addition, the TRP and ASIC channels play an important role in the detection of noxious stimuli. Thus, we examined the involvement of these channels in the analgesia mechanism of LED therapy. As illustrated in Fig. 5, an intraplantar injection of capsaicin (an activator of the TRPV1 channel, 5.2 nmol/paw), cinnamaldehyde (an activator of the TRPA1 channel, 10 nmol/paw), menthol (an activator of the TRPM8 channel, 1.2  $\mu$ mol/paw) or acidified saline (2% acetic acid in 0.9% saline, pH 5.0) produced marked nocifensive behavior in mice (Fig. 5A–D). Interestingly, LED treatment at an output power of 390 mW (Energy density 20.8 J/cm<sup>2</sup>) for 20 min significantly reduced the nocifensive behavior induced by capsaicin, menthol, acidified saline and cinnamaldehyde compared with the control group, with inhibitions of 40  $\pm$  5%, 46  $\pm$  10%, 35  $\pm$  13% and 59  $\pm$  6%, respectively (Fig. 5A–D).

Next, we examined the effect of the LED pad (390 mW, Energy density 20.8 J/cm<sup>2</sup>, for 20 min stimulation period) applied to the back of the animals on the nocifensive behavior induced by an intraplantar injection of cinnamaldehyde. In this experiment, the application of LED irradiation to the dorsal region of the animal also significantly reduced (inhibition of 58  $\pm$  9%) the nocifensive behavior caused by cinnamaldehyde (Fig. 5E); this result was similar (inhibition of 59  $\pm$  9%) to that observed when the LED irradiation was applied on the ventral region (Fig. 5D).

### *3.5 LED phototherapy reduces nocifensive behavior induced by noxious chemicals that activate protein kinase C (PKC) and adenylyl cyclase (AC)*

Peripheral sensitization is primarily due to inflammatory mediators, such as bradykinin, protons, prostaglandin E2, and glutamate [6, 40, 55]. These chemical mediators act on one of three types of cell-surface receptor expressed on the peripheral terminals of nociceptor neurons. For example, phospholipase C, phospholipase A2, and adenylyl cyclase are activated in response to the activation of G protein-coupled receptors, such as those for bradykinin, glutamate and prostaglandin E2. In turn, these signaling enzymes generate mediators that activate protein kinase A (PKA) or protein kinase C (PKC), which phosphorylate different ionic channels [e.g., TRPV1, sodium channel (Nav1.8)], which consequently reduces activation threshold and increases the response of peripheral terminals to chemical, mechanical and thermal nociceptive stimuli [6, 27, 40, 55]. Here, we confirmed previous findings and demonstrated that an intraplantar injection of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, an activator of PKC, 50 nmol/paw) or forskolin (an activator of AC, 50 nmol/paw) elicited marked nocifensive behavior in mice (Fig. 6A and B). However, the treatment of animals with LED irradiation (390 mW, Energy density 20.8 J/cm<sup>2</sup>, for 20 min stimulation period) significantly reduced these responses to PMA and forskolin compared with the control group, with inhibitions of 30 ± 10% and 42 ± 10%, respectively (Fig. 6A and B).

### *3.6 LED phototherapy reduces the pain behavioral reflex evoked by noxious heat stimuli*

The acute application of a high-intensity thermal stimulus to the skin is one of the most commonly used models to assess nociceptive processing in order to screen for the analgesic activity of a drug or physiological manipulation [5, 38]. Here, we used the hot plate test to observe the pain reaction in response to heat. The hot plate test evaluates supraspinal analgesic effects and reflects the activity of thermally sensitive afferent fibers and the activity of A $\delta$  and C fibers. As illustrated in Fig. 7, the treatment of animals with LED irradiation at

an output power of 390 mW (Energy density  $20.8 \text{ J/cm}^2$ ) for 20 min significantly increased the pain latency in the hot-plate test compared with the control group.

### *3.7 LED analgesia depends on central afferents fibers sensitive to capsaicin*

Several studies show that capsaicin, which acts on the TRPV1 receptor, plays an important role in processing and modulating pain signals in animal models [6, 27, 40, 52, 55, 64]. In addition, TRPV1 is found not only on peripheral nerve endings but also in the spinal cord, where its expression appears to be restricted to the central branches of small and medium-sized fibers located in the dorsal root ganglia and in the superficial dorsal horn. Moreover, the intrathecal administration of capsaicin results in a rapid inactivation of C-fibers at the peripheral terminals, which likely results from direct actions on the spinal cord; substance P or other substances released from primary afferent nerve terminals play a prominent role in such desensitization. Thus, the desensitization of the TRPV1 receptors in the spinal cord inhibits the nociceptive pathway [52]. Here, we confirmed previous findings and demonstrated that an intrathecal injection of capsaicin significantly increased the pain latency in the hot-plate test compared with the vehicle group (Fig. 8A). Furthermore, we demonstrate that the nocifensive behavior observed in the formalin model was partially, but significantly, reduced with an intrathecal injection of capsaicin compared with the vehicle group (Fig. 8B and C). Interestingly, animals treated with intrathecal capsaicin following LED irradiation (390 mW, Energy density  $20.8 \text{ J/cm}^2$  for 20 min) did not exhibit reductions in nocifensive behavior induced by formalin (Fig. 8B and C). However, animals treated with intrathecal injections of vehicle and subsequently irradiated with the LED (390 mW, Energy density  $20.8 \text{ J/cm}^2$  for 20 min) showed a significant reduction in nocifensive behavior induced by formalin (Fig. 8B and C). Thus, we suggest that the efficacy of LED analgesia depends on the integrity of central afferent C-fibers sensitive to capsaicin.

#### 4. Discussion

LEDs, following laser and intense pulsed light, have become a new favorite medical phototherapy. Currently, the application of LEDs is not only thriving in the field of low-intensity photo-rejuvenation but is employed to treat rhinitis, arthritis, jaundice, joint/tissue inflammation, skin abnormalities, stress, seasonal affective disorder, and biological clock disorders [4, 18, 54, 57, 74]. Although several preclinical and clinical studies have demonstrated the positive effects of LED phototherapy, such as accelerating wound healing and reducing pain in a large variety of acute and chronic painful conditions [4, 13, 14, 23, 31, 35, 36, 39, 41, 43, 47, 48, 51, 53, 54, 58, 65, 67, 69, 70], its effects on acute pain and the mechanisms involved in these effects are poorly understood. However, LED phototherapy appears to exert a wide range of effects at the molecular, cellular, and tissue levels. In the current study, we demonstrated that multisource LED phototherapy applied at an output power of 390 mW (Energy density  $20.8 \text{ J/cm}^2$ ), 780 mW (Energy density  $31.2 \text{ J/cm}^2$ ) and, to a lesser extent, 234 mW (Energy density  $10.4 \text{ J/cm}^2$ ) reduces acute nocifensive behavior induced by chemical noxious stimuli in mice. In addition, multisource LED phototherapy applied at an output power of 390 mW (Energy density  $20.8 \text{ J/cm}^2$ ) effectively reduced the thermal nocifensive behavior induced by a hot plate. Moreover, we also showed that the sensory terminals in the spinal cord sensitive to capsaicin are involved in analgesia produced by LED phototherapy. To our knowledge, this study is the first to examine this type of multisource LED phototherapy for the acute nociceptive response.

Normally, nociception and the perception of pain are evoked only by toxic molecules, inflammatory mediators, and at pressures and temperatures that are sufficiently extreme to potentially injure tissues [6, 21, 55]. These high-threshold physical and noxious chemical stimuli are detected by specialized peripheral sensory neurons (nociceptors). Although the morphology of sensory nociceptive nerve endings is highly conserved in animals from rodents

to humans [21], cutaneous nociceptors are an extremely heterogeneous group of neurons housed in peripheral sensory ganglia located just outside the CNS that transduce external noxious stimuli in the skin, up to meters away from their cell bodies [21]. Moreover, a large array of endogenous chemicals (i.e., glutamate, prostaglandins, bradykinin, protons, and cytokines, among others) contributes to sensory phenomena, including pain and hyperalgesia, that develop during inflammation and after tissue and nerve injury [6, 21, 55].

Many tests of nociception and pain in animals have been developed, and rats and mice are most frequently used in this type of research. Additionally, the vast majority of nociception models measure acute pain [5, 38]. However, the choice of test is a critical step because different nociceptive modalities are, at least partially, processed via different molecular transducers and fibers [5, 38, 68]. Here, we utilized tests that measure the nociceptive response generated by a noxious chemical (i.e., formalin, acetic acid, capsaicin, menthol, and acidified saline, among others) and thermal (hot plate test) stimuli. Primary afferent fibers have been classified into three major types: unmyelinated C, myelinated thin A $\delta$ , and myelinated A $\beta$  fibers. The nociceptors of C fibers and A $\delta$  fibers conduct noxious chemical, mechanical or thermal stimuli to elicit nociceptive responses. Conversely, the stimulation of A $\beta$  fibers is thought to mostly induce an innocuous tactile sensation [3, 38, 68]. Notably, electrophysiological and behavioral studies demonstrated that primary nociceptive afferent fibers (A $\delta$ -fibers and C-fibers) exhibit sustained firing during both phases of the formalin test [44, 56, 68] and in the pain behavior induced by the acetic acid and hot plate models [5, 32, 38].

The current study demonstrated for the first time that the application of multisource LED phototherapy was able to reduce the acute nocifensive behavior caused by formalin and acetic acid. Herein, we demonstrated that the analgesic efficacy of the LED treatment depended, at least in part, on dose: whereas the analgesic activity was significant at an output

power of 390 mW and to a lesser extent at 780 mW, treatment was ineffective at an output power of 290 mW in the formalin model. These observations were confirmed by nocifensive behavior caused by acetic acid. In addition, we also demonstrated that the maximum analgesic effect of LED treatment in the acetic acid model occurs rapidly and gradually reduced but remained significant up to 7 h after LED treatment. This rapid and long-lasting analgesic action of LED phototherapy is important and reaffirms its potential in pain management.

The ability of formalin and acetic acid to induce pain behavior depends on tissue injury and consequently the release of endogenous mediators, including glutamate, bradykinin, and prostanoids, at the sensory polymodal neurons [16, 24, 59, 62]. Therefore, we also evaluated the effect of LED phototherapy on the nocifensive behavior induced by the endogenous mediators glutamate, bradykinin, and prostaglandin E2. Our results demonstrate that the LED treatment at an output power of 390 mW effectively blocked the nociceptive responses caused by glutamate, prostaglandin E2 and bradykinin. Thus, light phototherapy influences the synthesis, release, and metabolism of numerous transmitter signal substances involved in pain, such as nitric oxide, prostaglandin and cytokinins [4, 13, 14, 31, 36, 41, 43, 47, 57]. Furthermore, LED treatment at an output power of 390 mW significantly reduced the nocifensive behavior elicited by noxious chemicals that activate TRPV1, TRPA1, TRPM8 and ASIC channels, such as capsaicin, cinnamaldehyde, menthol and acidified saline, respectively [6, 21, 37, 55]. However, the facilitatory effect of pain transmission by chemosensors is subject to modulation by phosphorylation, which is catalyzed by various enzymes, including protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase [6, 21, 37, 55]. Therefore, we also evaluated the effect of LED phototherapy on nocifensive behavior induced by phorbol 12-myristate 13-acetate, an activator of PKC, and forskolin, an activator of AC, which increases the intracellular levels of cyclic AMP that acts by activating of PKA [6, 21, 37, 55]. Herein, we demonstrated that LED treatment significantly reduced the nocifensive



response induced by PMA and forskolin, which strongly suggests that the LED phototherapy can counteract the activation of PKC and PKA caused by chemosensors, including endogenous (glutamate, prostaglandin E2 and bradykinin) and exogenous (TRPV1, TRPA1, TRPM8 and ASIC channels agonists) noxious chemicals. Additionally, the pain behavioral reflex evoked by noxious heat stimuli in the hot-plate test was significantly reduced by LED treatment. These findings support that LED phototherapy plays an important role in the activation of molecular sensors/transducers or neuronal conduction. Taken together, our findings and those from previous studies suggest, at least in part, that the analgesic action of LED phototherapy is associated with its ability to penetrate the skin and affect cellular processes, including the production of inflammatory mediators to transmit pain [18]. Specifically, the analgesic effect of LED treatment was entirely dependent upon TRPV1-expressing nociceptors because intrathecal capsaicin administration, which selectively eliminates the central (dorsal horn) terminals of TRPV1-expressing afferents, completely reversed the analgesic effect of LED phototherapy. Notably, the intrathecal injection of capsaicin destroys unmyelinated C-fibers. These fibers express the neuropeptide substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP), which constitutes the majority of C fiber nociceptors [52].

Although LED treatment effectively reduces the pain behavior of animals induced by chemical and thermal noxious stimuli, LED phototherapy requires further characterization. Furthermore, phototherapy using laser or LED irradiation operates directly at the level of the epidermal neural network, but the effects move to nerves in subcutaneous tissues, sympathetic ganglia, and the neuromuscular junctions within muscles and nerve trunks. In addition, phototherapy can act like an anesthetic agent by disrupting the cytoskeleton for several hours, as evidenced by formation of reversible varicosities or beading along the axons, which in turn cause mitochondria to “pile up” where the cytoskeleton is disrupted [7, 17, 18]. A correct

dose of phototherapy also decreases the mitochondrial membrane potential (MMP) in DRG neurons, which reduces ATP production and consequently leads to neural blockade. The most immediate effect of nociceptor blockade is pain relief, which occurs within a few minutes and has been demonstrated by the timed onset of a conduction blockade in somatosensory-evoked potentials (SSEPs) [12, 18].

In summary, our data clearly show that the analgesic effect of LED phototherapy may be associated, at least in part, with its ability to directly or indirectly reduce the activation of nociceptors by thermal and chemical (both endogenous and exogenous substances) noxious stimuli. Additionally, we have also demonstrated that LED analgesia depends on the integrity of central afferent C-fibers sensitive to capsaicin. Thus, LED phototherapy should be considered an important tool for the management of acute pain.

**Conflict of interest statement**

The authors have no conflicts of interest.

**Acknowledgements**

The authors would like to acknowledge the following sources of funding: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. Furthermore, we thank the Leandro Flores Nascimento for the art & design work for the Figure 1, which illustrates the schematic representation of the experimental design, treatments and behavioral tests performed on this study.

## References

- [1] Amat A., J. Rigau, R.W. Waynant, I.K. Ilev, J.J. Anders. The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy: A hypothesis of mechanism. *J Photochem Photobiol B* 2006; 82(2):152-160.
- [2] Baggio C.H., C.S. Freitas R. Marcon, M.F. Werner, G.A. Rae, F.R. Smiderle, G.L. Sasaki, M. Iacomini, M.C. Marques, A.R.S. Santos. Antinociception of  $\beta$ -D-glucan from *Pleurotus pulmonarius* is possibly related to protein kinase C inhibition. *Int J Biol Macromol* 2012;50(3):872-877.
- [3] Baliki M.N., A.V. Apkarian. Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. *Neuron* 2015; 87(3): 474–491.
- [4] Barolet D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Semin Cutan Med Surg* 2008;27(4):227-238.
- [5] Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* 2012;211:39-50.
- [6] Basbaum A.I., D.M. Bautista, G. Scherrer, D. Julius. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009;139(2):267-284.
- [7] Baxter G.D., D.M. Walsh, J.M. Allen, A.S. Lowe, A.J. Bell. Effects of low intensity infrared laser irradiation upon conduction in human median nerve in vivo. *Exp Physiol* 1994;79(2): 227-234.
- [8] Carr D.B., L.C. Goudas. Acute pain. *Lancet*. 1999;353:2051-2058.
- [9] Carr E.J.C., P. Meredith, G. Chumbley, R. Killen, D.R. Prytherch, G.B. Smith. Pain: A quality of care issue during patients' admission to hospital. *J Adv Nurs* 2014;70(6):1391–1403.

- [10] Cavanaugh D.J., H. Lee, L. Lo, S.D. Shields, M.J. Zylka, A.I. Basbaum, D.J. Anderson. Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(22):9075-9080.
- [11] Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Health Statistics. FastStats. Inpatient Surgery. 2010. Available at: <http://www.cdc.gov/nchs/fastats/insurg.htm>. Accessed August 16, 2015.
- [12] Chow R.T., M.A. David, P.J. Armati. 830 nm laser irradiation induces varicosity formation, reduces mitochondrial membrane potential and blocks fast axonal flow in small and medium diameter rat dorsal root ganglion neurons: implications for the analgesic effects of 830 nm laser. *J Peripher Nerv Syst* 2007; 12(1): 28-39.
- [13] Cidral-Filho F.J., D.F. Martins, A.O. Moré, L. Mazzardo-Martins, M.D. Silva, E. Cargnin-Ferreira, A.R.S. Santos. Light-emitting diode therapy induces analgesia and decreases spinal cord and sciatic nerve tumour necrosis factor- $\alpha$  levels after sciatic nerve crush in mice. *Eur J Pain* 2013;17(8):1193-204.
- [14] Cidral-Filho F.J., L. Mazzardo-Martins, D.F. Martins, A.R.S. Santos. 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 Med Sci*. 2014;29(2):695-702.
- [15] Córdova M.M., M.F. Werner, M.D. Silva, A.P. Ruani, M.G. Pizzolatti, A.R.S. Santos. Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice. *Neurosci Lett* 2011 20;495(3):173-177.
- [16] Corrêa C.R., J.B. Calixto. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br J Pharmacol* 1993;110(1):193-198.
- [17] Cotler H.B. A NASA discovery has current applications in orthopaedics. *Curr Orthop Pract* 2015; 26(1):72-74.

- [18] Cotler H.B., R.T. Chow, M.R. Hamblin, J. Carroll. The Use of Low Level Laser Therapy (LLLT) For Musculoskeletal Pain. *MOJ Orthop Rheumatol* 2015; 2(5): 00068
- [19] de Castro I.C., C.B. Rosa, C.M. Carvalho, J.S. Aragão, M.C. Cangussu, J.N. Santos, A.L. Pinheiro. Assessment of different energy delivery settings in laser and LED phototherapies in the inflammatory process of rat's TMJ induced by carrageenan. *Lasers Med Sci* 2015; DOI 10.1007/s10103-015-1748-z.
- [20] Desmet K.D., D.A. Paz, J.J. Corry, J.T. Eells, M.T. Wong-Riley, M.M. Henry, E.V. Buchmann, M.P. Connelly, J.V. Dovi, H.L. Liang, D.S. Henshel, R.L. Yeager, D.S. Millsap, J. Lim, L.J. Gould, R. Das, M. Jett, B.D. Hodgson, D. Margolis, H.T. Whelan. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. *Photomed Laser Surg* 2006;24(2):121-128.
- [21] Dubin A.E., A. Patapoutian. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 2010;120(11):3760-72.
- [22] Dubuisson D., Dennis S.G.. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977;4:161–174.
- [23] Esper M.A., R.A. Nicolau, E.A. Arisawa. The effect of two phototherapy protocols on pain control in orthodontic procedure--a preliminary clinical study. *Lasers Med Sci* 2011;26(5):657-663.
- [24] Feng Y., M. Cui, W.D. Willis. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. *Anesthesiology* 2003; 98(3):729-733.
- [25] Ferreira J., A.R.S. Santos, J.B. Calixto. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. *Neuropharmacology* 1999; 38(6):835-42.

- [26] Flor H. Psychological pain interventions and neurophysiology: implications for a mechanism-based approach. *Am Psychol.* 2014; 69(2):188-196.
- [27] Gold M.S., Gebhart G.F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med* 2010; 16(11):1248-1257.
- [28] Gordon D.B., Pellino TA, Miaskowski C, McNeill JA, Paice JA, Laferriere D, Bookbinder M. A 10-year review of quality improvement monitoring in pain management: Recommendations for standardized outcome measure. *Pain Manag Nurs* 2002;3(4):116-130.
- [29] Gupta A., S. Daigle, J. Mojica, R.W. Hurley. Patient perception of pain care in hospitals in the United States. *J Pain Res* 2009;2:157-164.
- [30] He W.L., C.J. Li, Z.P. Liu, J.F. Sun, Z.A. Hu, X. Yin, S.J. Zou. Efficacy of low-level laser therapy in the management of orthodontic pain: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci* 2013;28(6):1581-1589.
- [31] Honmura A, A. Ishii, M. Yanase, J. Obata, E. Haruki. Analgesic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. *Lasers Surg Med* 1993; 13:463–469.
- [32] Ikeda Y., A. Ueno, H. Naraba, S. Oh-ishi. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acid-induced writhing responses of mice. *Life Sci* 2001; 69(24):2911-2919.
- [33] Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations. Improving the Quality of Pain Management Through Measurement and Action. 2003. Available at: <http://www.npcnow.org/system/files/research/download/Improving-the-Quality-of-Pain-Management-Through-Measurement-and-Action.pdf> (Acessed August 10, 2015).
- [34] Kim W.-S., R.G. Calderhead. Is light-emitting diode phototherapy (LED-LLLT) really effective? *Laser Ther.* 2011;20(3):205-215.

- [35] Kuboyama N., Y. Abiko. Reduction of monocyte chemoattractant protein-1 expression in rheumatoid arthritis rat joints with light-emitting diode phototherapy. *Laser Ther.* 2012;21(3):177-181.
- [36] Kwon H., W. Lim, J. Kim, S. Jeon, S. Kim, S. Karna, H. Cha, O. Kim, H. Choi. Effect of 635 nm irradiation on high glucose-boosted inflammatory responses in LPS-induced MC3T3-E1 cells. *Lasers Med Sci* 2013;28(3):717-24.
- [37] Latorre R., S. Brauchi, G. Orta, C. Zaelzer, G. Vargas. ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium.* 2007;42(4-5):427-38.
- [38] Le Bars D., M. Gozariu, S.W. Cadden. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 2001;53(4):597-652.
- [39] Lee G.Y., W.S. Kim. The systemic effect of 830-nm LED phototherapy on the wound healing of burn injuries: A controlled study in mouse and rat models. *J Cosmet Laser Ther.* 2012;14(2):107-110.
- [40] Levine J.L., N. Alessandri-Haber. TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772(8):989-1003.
- [41] Lim W., S. Lee, I. Kim, M. Chung, M. Kim, H. Lim, J. Park, O. Kim and H. Choi. The anti-inflammatory mechanism of 635 nm light-emitting-diode irradiation compared with existing COX inhibitors. *Lasers Surg. Med* 2007; 39, 614–621.
- [42] Littlejohn G. Neurogenic neuroinflammation in fibromyalgia and complex regional pain syndrome. *Nat Rev Rheumatol* 2015; doi: 10.1038/nrrheum.2015.100.
- [43] Marcos R.L., E.C. Leal-Junior, G. Arnold, V. Magnenet, R. Rahouadj, X. Wang, F. Demeurie, J. Magdalou, M.H. Carvalho, R.A. Lopes-Martins. Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects. *J Orthop Res* 2012;30(12):1945-51.



- [44] McCall W.D., K.D. Tanner, J.D. Levine. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. *Neurosci Lett* 1996; 208(1):45-8.
- [45] McGrath P.A. Psychological aspects of pain perception. *Arch Oral Biol* 1994;39 Suppl:55S-62S.
- [46] Meotti F.C., I.S. Coelho, A.R.S. Santos. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. *J Pain* 2010;11(6):570-578.
- [47] Montoro L.A., A.P. Turrioni, F.G. Basso, C.A. de Souza Costa, J. Hebling. Infrared LED irradiation photobiomodulation of oxidative stress in human dental pulp cells. *Int Endod J* 2014;47(8):747-55.
- [48] Moura Júnior M.J., E.A. Arisawa, A.A. Martin, J.P. de Carvalho, J.M. da Silva, J.F. Silva, L. Silveira Jr. Effects of low-power LED and therapeutic ultrasound in the tissue healing and inflammation in a tendinitis experimental model in rats. *Lasers Med Sci* 2014;29(1):301-311.
- [49] Nadur-Andrade N., S.R. Zamuner, E.F. Toniolo, C.J. de Lima, J.C. Cogo, C.S. Dale. Analgesic Effect of Light-Emitting Diode (LED) Therapy at Wavelengths of 635 and 945 nm on Bothrops moojeni Venom-Induced Hyperalgesia. *Photochem Photobiol.* 2014; 90: 207–213.
- [50] Nascimento F.P., S.M. Figueredo, R. Marcon, D.F. Martins, S.J. Macedo Jr, D.A. Lima, R.C. Almeida, R.M. Ostroski, A.L.S. Rodrigues, A.R.S. Santos. Inosine reduces pain-related behavior in mice: involvement of adenosine A1 and A2A receptor subtypes and protein kinase C pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;334(2):590-598.
- [51] Nobel J.G., A.S. Lowe, G.D. Baxter. Monochromatic infrared irradiation (890 nm): effect of a multisource array upon conduction in the human median nerve. *J Clin Laser Med Surg.* 2001,19:291-5.

- [52] O'Neill J., C. Brock, A.E. Olesen, T. Andresen, M. Nilsson, A.H. Dickenson. Unravelling the Mystery of Capsaicin: A Tool to Understand and Treat Pain. *Pharmacol Rev* 2012; 64(4):939–971.
- [53] Panhoca V.H., R.F. Lizarelli, S.C. Nunez, R.C. Pizzo, C. Grecco, F.R. Paolillo, V.S. Bagnato. Comparative clinical study of light analgesic effect on temporomandibular disorder (TMD) using red and infrared led therapy. *Lasers Med Sci* 2015;30(2):815-822.
- [54] Peplow P.V., T.Y. Chung, G.D Baxter. Photodynamic modulation of wound healing: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg* 2012;30(3):118-48.
- [55] Petho G., P.W. Reeh. Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. *Physiol Rev* 2012;92(4):1699-775.
- [56] Puig S., L.S. Sorkin. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain* 1996; 64(2):345-55.
- [57] Quirk B.J., H.T. Whelan. Near-Infrared Irradiation Photobiomodulation: The Need for Basic Science. *Photomed Laser Surg* 2011;29(3):143-4.
- [58] Reddy K. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J Clin Laser Med Sur* 2004;22(2):141-150
- [59] Ribeiro R.A., M.L. Vale, S.M. Thomazzi, A.B. Paschoalato, S. Poole, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol* 2000; 387(1):111-118.
- [60] Rimulo A.L., M.C. Ferreira, M.H. Abreu, J.C. Aguirre-Neto, S.M. Paiva. Chemotherapy-induced oral mucositis in a patient with acute lymphoblastic leukaemia. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2011;12(2):124-127.
- [61] Roth W., J. Kling, I. Gockel. Dissatisfaction with post-operative pain management - a prospective analysis of 1071 patients. *Acute Pain* 2005;7:75-83.

- [62] Santos A.R.S., E.M. Vedana, G.A. Freitas. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. *Inflamm Res* 1998;47(7):302-307.
- [63] Santos A.R.S., J.B. Calixto. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neurosci Lett* 1997;235(1-2):73-76.
- [64] Scanlon G.C., M.S. Wallace, J.S. Ispirescu, G. Schulteis. Intradermal capsaicin causes dose-dependent pain, allodynia, and hyperalgesia in humans. *J Investig Med* 2006; 54:238–244.
- [65] Spitler R., M.W. Berns. Comparison of laser and diode sources for acceleration of in vitro wound healing by low-level light therapy. *J Biomed Opt* 2014;19(3): 38001.
- [66] Swislocki A. , M. Orth, M. Bales, J. Weisshaupt, C. West, J. Edrington, B. Cooper, L. Saputo, M. Islas, C. Miaskowski. A randomized clinical trial of the effectiveness of photon stimulation on pain, sensation, and quality of life in patients with diabetic peripheral neuropathy. *J Pain Symptom Manage* 2010;39(1):88-99.
- [67] Teuschl A., E.R. Balmayor, H. Redl, M. van Griensven, P. Dungal. Phototherapy with LED light modulates healing processes in an in vitro scratch-wound model using 3 different cell types. *Dermatol Surg* 2015;41(2):261-268.
- [68] Tjølsen A., O.B. Berge, S. Hunskaar, J.H. Rosland, K. Hole. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992;51(1):5-17.
- [69] Vinck E., B. Cagnie, P. Coorevits, G. Vanderstraeten, D. Cambier. Pain reduction by infrared light-emitting diode irradiation: a pilot study on experimentally induced delayed-onset muscle soreness in humans. *Lasers Med Sci* 2006;21(1):11-18.
- [70] Vinck E., P. Coorevits, B. Cagnie, M. Muynck, G. Vanderstraeten, D. Cambier. Evidence of changes in sural nerve conduction mediated by light emitting diode irradiation. *Lasers Med Sci* 2005;20(1):35–40.

- [71] Whelan H.T., J.F. Connelly, B.D. Hodgson, L. Barbeau, A.C. Post, G. Bullard, E.V. Buchmann, M. Kane, N.T. Whelan, A. Warwick, D. Margolis. NASA light-emitting diodes for the prevention of oral mucositis in pediatric bone marrow transplant patients. *J Clin Laser Med Surg* 2002;20(6):319-24.
- [72] World Health Organization Library Cataloguing-in-Publication Data. Compendium of innovative health technologies for low-resource settings: assistive devices, eHealth solutions, medical devices. 2014. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/108781/1/9789241564731eng.pdf?ua=1> (Accessed August 04, 2015).
- [73] Wuhrman E., M.F. Cooney. *Acute Pain: Assessment and Treatment*. Medscape 2011; Available at: <http://www.medscape.com/viewarticle/735034>. Accessed August 10, 2015.
- [74] Yeh N.G., C.-H. Wu, T.C. Cheng. Light-emitting diodes—Their potential in biomedical applications. *Renew Sustain Energy Rev* 2010; 14(8): 2161–2166.
- [75] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16(2):109-10.

## Legend to Figures

Figure 1. Schematic representation of the experimental design, treatments and tests performed on this study.

Figure 2. Effect of LED phototherapy on nocifensive behavior induced by intraplantar injection of formalin in mice. The total time spent licking the hind paw was measured during the neurogenic phase (0–5 min, panel A and D) and the inflammatory phase (15–30 min, panel B and E). Panel C represents the paw edema, as indicated by the difference paw thickness before and after formalin challenge. Each point or column represents the mean value obtained for 7 to 12 animals, and the vertical lines indicate the S.E.M. Inverted triangles ( $\nabla$ ) and closed columns (C) indicate the LED off-state (control group), and the open circles (O), squares ( $\square$ ) and triangles ( $\Delta$ ) and open columns correspond to animals treated with different doses of LED phototherapy. The asterisks denote the significance levels when compared with the control group (one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .

Figure 3. Effect of LED phototherapy on the nocifensive behavior of mice induced by an intraperitoneal injection of acetic acid. Each column or point represents the mean value obtained for 7 to 12 animals, and the vertical lines indicate the S.E.M. Closed columns (C) indicate the LED off-state (control group), and open columns correspond to animals treated with different doses LED phototherapy (panel A). The asterisks denote the significance levels compared with the control group (one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test), \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ . Panel B represents the time course of the analgesic effect of LED phototherapy in the acetic acid test. Closed circles ( $\bullet$ ) indicate the LED off-state (C),

and open squares ( $\square$ ) correspond to animals treated with LED irradiation (390 mW/20 min) for 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 7, and 8 h before acetic acid injection. The asterisks denote the significance levels when compared with the control group (two-way ANOVA followed by Bonferroni test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ ).

Figure 4. Effect of LED phototherapy on the nocifensive behavior of mice induced by an intraplantar injection of glutamate (20  $\mu\text{mol/paw}$ , panel A), bradykinin (3  $\text{nmol/paw}$ , panel B) or prostaglandin E2 (3  $\text{nmol/paw}$ , panel C). Each column represents the mean value obtained for 6 to 9 animals, and the vertical lines indicate the S.E.M. Closed columns (C) indicate the LED off-state (control group), and open columns correspond to animals treated with LED (390 mW/20 min) phototherapy. The asterisks denote the significance levels when compared with the control group (unpaired Student's t test), \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .

Figure 5. Effect of LED phototherapy on the nocifensive behavior of mice induced by an intraplantar injection of capsaicin (5.2  $\text{nmol/paw}$ , panel A), menthol (1.2  $\mu\text{mol/paw}$ , panel B), acidified saline (pH 5.0/ $\text{paw}$ , panel C) and cinnamaldehyde (10  $\text{nmol/paw}$ , panel D and E). Each column represents the mean value obtained for 6 to 8 animals, and the vertical lines indicate the S.E.M. Closed columns (C) indicate the LED off-state (control group), and open columns correspond to animals treated with LED (390 mW/20 min) phototherapy. Panels A-D represent the results obtained from the application of LED irradiation to the ventral region. Panel E represents the results obtained from the application of LED irradiation to the dorsal region. The asterisks denote the significance levels when compared with the control group (unpaired Student's t test), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .

Figure 6. Effect of LED phototherapy on the nocifensive behavior of mice induced by an intraplantar injection of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 50 nmol/paw, panel A) or forskolin (10 nmol/paw, panel B). Each column represents the mean value obtained for 6 to 9 animals, and the vertical lines indicate the S.E.M. Closed columns (C) indicate the LED off-state (control group), and open columns correspond to animals treated with LED (390 mW/20 min) phototherapy. The asterisks denote the significance levels when compared with the control group (unpaired Student's t test), \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .

Figure 7. Effect of LED phototherapy on the pain behavioral reflex of mice evoked by noxious heat stimuli in the hot-plate test at 50 °C. Each column represents the mean value obtained for 6 to 9 animals, and the vertical lines indicate the S.E.M. Closed columns (C) indicate the LED off-state (control group), and open columns correspond to animals treated with LED (390 mW/20 min) phototherapy. The asterisks denote the significance levels when compared with the control group (unpaired Student's t test), \*\*\* $p < 0.001$ .

Figure 8. Involvement of central afferent fibers sensitive to capsaicin in the analgesic effect of LED phototherapy in mice. Panel A represents the pain behavioral reflex evoked in response to noxious heat stimuli (hot-plate test at 50 °C) following intrathecal capsaicin (10 µg/site) or vehicle (5 µl/site) treatments. Panels B and D represent the nocifensive behavior measured during the neurogenic phase (0–5 min, panel A) and the inflammatory phase (15–30 min, panel B) of the formalin model following intrathecal capsaicin (10 µg/site) or vehicle (5 µl/site) treatments. Each column represents the mean value obtained from 8 animals, and the vertical lines indicate the S.E.M. Closed columns (C) indicate the LED off-state (control group), and open columns corresponds to animals treated with LED (390 mW/20 min) phototherapy. The asterisks denote the significance levels when compared with the vehicle

group not treated with LED irradiation (two-way ANOVA followed by Bonferroni test), \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ . NS, not significant when compared with the capsaicin group not treated with LED irradiation or the vehicle group treated with LED irradiation (two-way ANOVA followed by Bonferroni test).



Figure 1

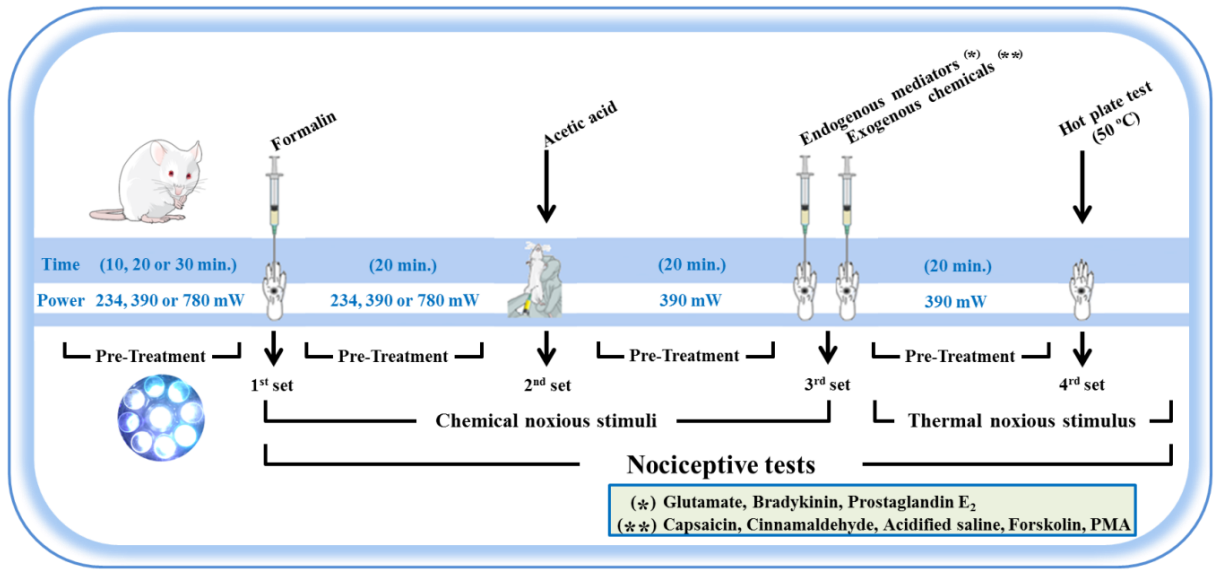


Figure 2

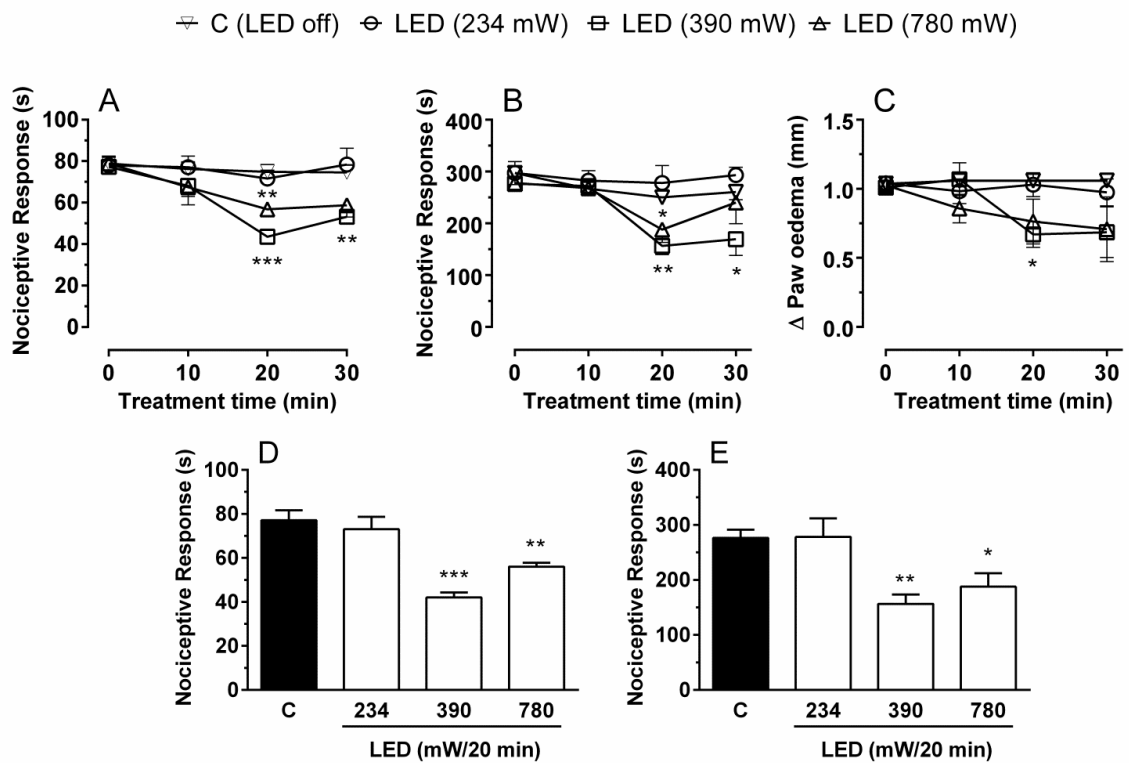


Figure 3

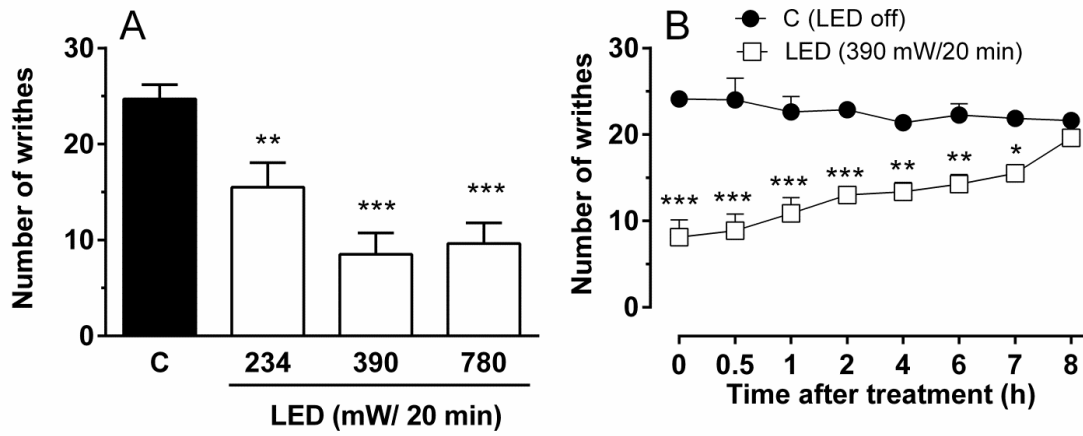


Figure 4

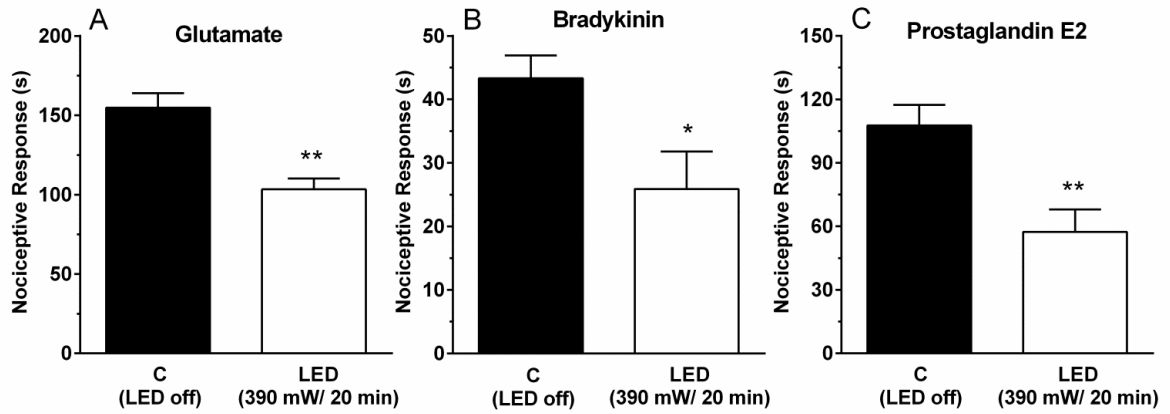


Figure 5

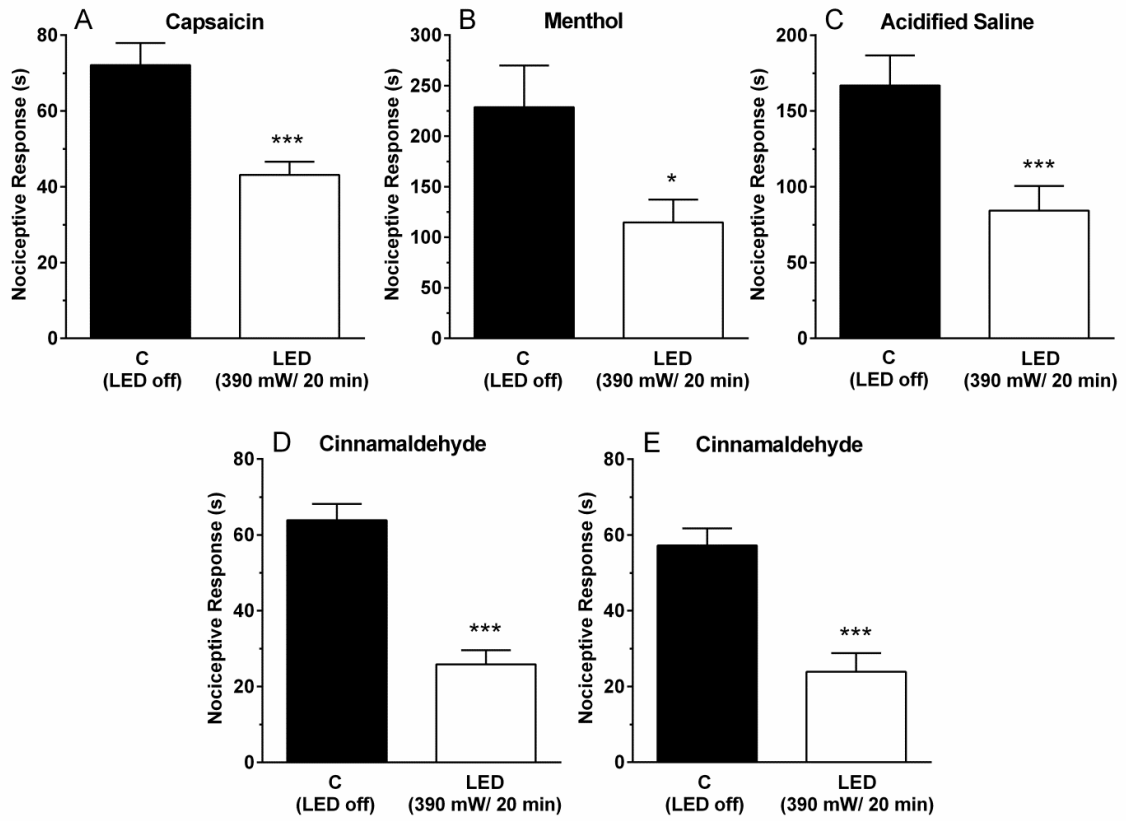


Figure 6

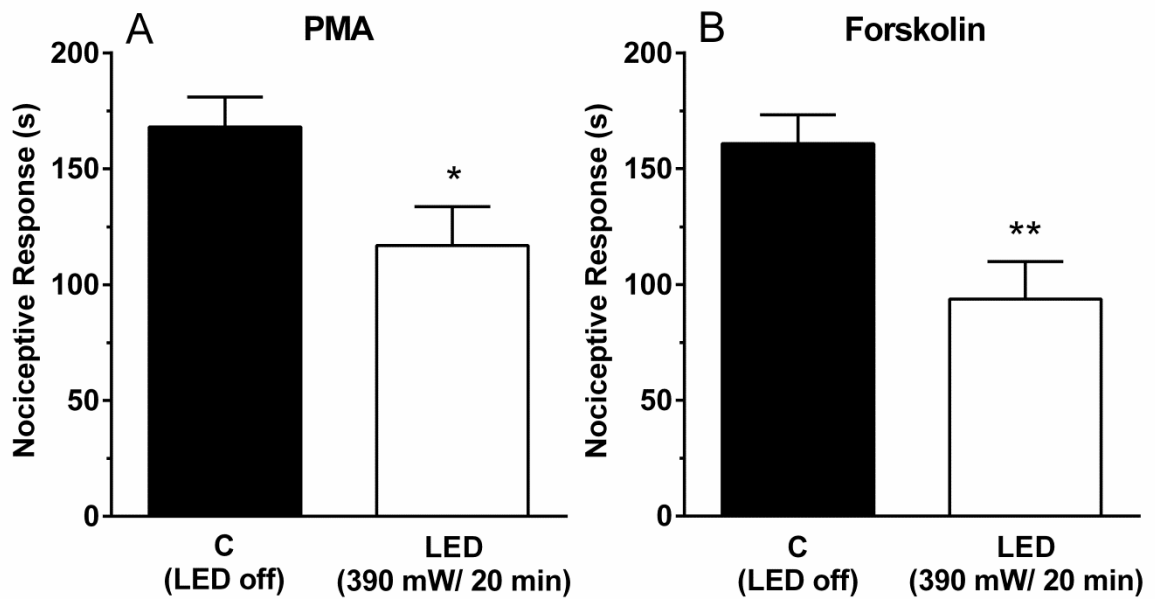


Figure 7

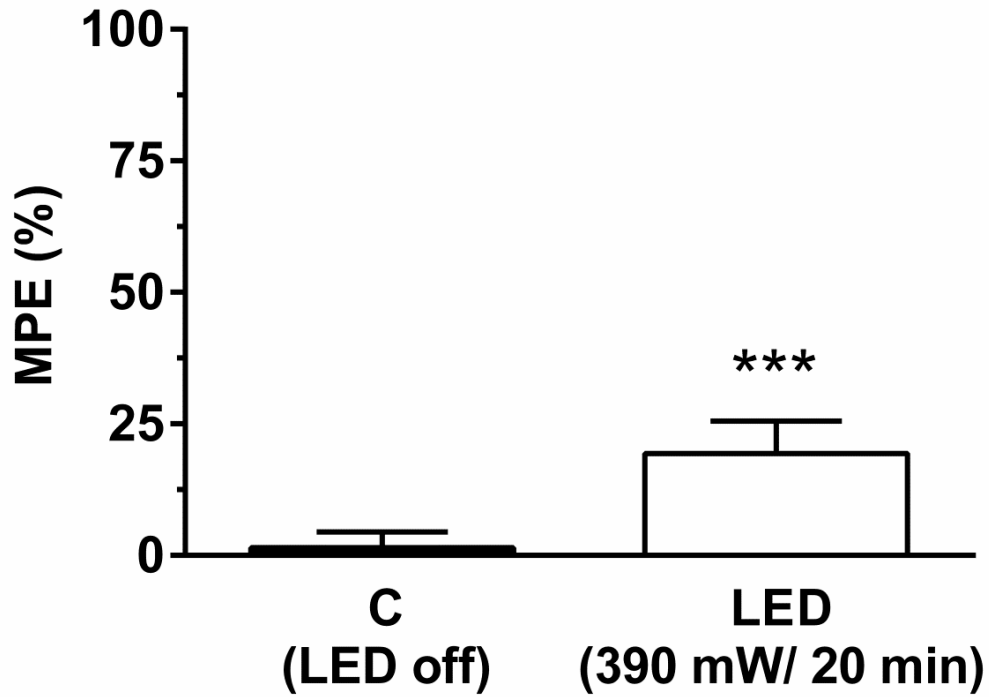


Figure 8

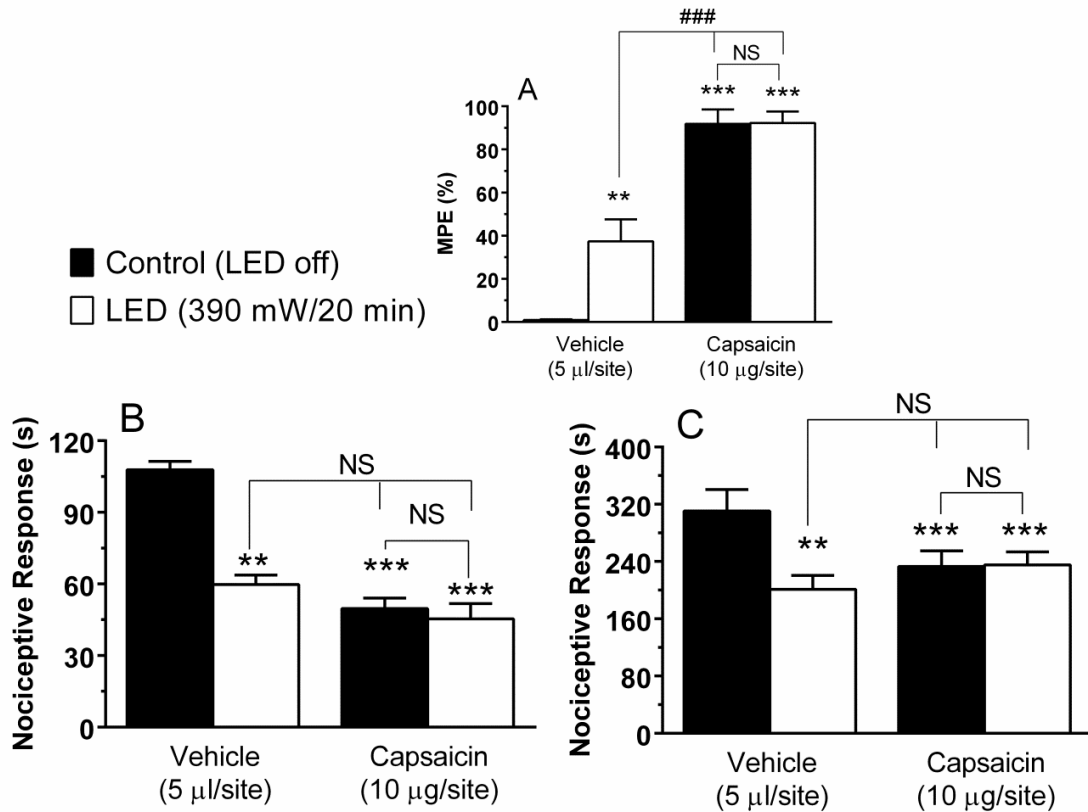


Table 1. Physical parameters (Output power, Energy density and Power density) used in the experiments.

Output power	Irradiation			Power density (mW/cm <sup>2</sup> )
	Energy density (J/cm <sup>2</sup> )			
	10 min	20 min	30 min	
234 mW	6.2	12.4	18.7	10.4
390 mW	10.4	20.8	31.2	17.3
780 mW	20.8	41.6	62.4	34.6

## **6 DADOS ADICIONAIS**

### **6.1 Materiais e métodos**

### **6.2 Drogas e reagentes**

Morfina (União Química, Brazil), cloridrato de naloxona (Cristália, SP, Brasil), L-arginina, D-arginina e N $\omega$ -nitro-L-arginina (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA), adenosina, cafeína, 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina (DPCPX) foram dissolvidos em solução salina (0,9 %), {1,3,5}triazin-5-il-amino]etil)fenol (ZM 241385) (Tocris Cookson Inc., Ellisville, EUA) foram dissolvidos em solução salina (0,9%) com 5% de dimetil sulfoxido (DMSO). A concentração final de DMSO não excedeu 5% e não causou qualquer efeito 'per se'.

### **6.3 Envolvimento opioidérgico**

Para avaliar o envolvimento do sistema opioide no efeito analgésico da LEDT, os animais foram pré-tratados com: uma injeção sistêmica de solução salina (10 ml/kg, i.p.) ou naloxona (antagonista não seletivo de receptores opioides, 10 mg/kg, i.p.) 20 minutos antes do tratamento com a LEDT (390 mW, 20,8 J/cm<sup>2</sup>) ou morfina (agonista não seletivo de receptores opioides, 2,5 mg/kg, s.c.). A nocicepção aguda causado pelo cinamaldeído foi avaliada imediatamente após o tratamento com a LEDT e 30 minutos após o tratamento com a morfina. As doses de todas as substâncias utilizadas foram escolhidas com base nos dados da literatura (MARTINS et al., 2012).

### **6.4 Envolvimento do Sistema Adenosinérgico**

Para avaliar o envolvimento do sistema adenosinérgico no efeito analgésico da LEDT, os animais foram pré-tratados com: uma injeção sistêmica de solução salina (10 ml/kg, i.p.)

ou cafeína (antagonista não seletivo de receptores adenosinérgicos, 10 mg/kg, i.p.) 20 minutos antes do tratamento com a LEDT (390 mW, 20,8 J/cm<sup>2</sup>) ou adenosina (agonista não seletivo de receptores adenosinérgicos, 100 mg/kg, i.p.). A nocicepção aguda causado pelo cinamaldeído foi avaliada imediatamente após o tratamento com a LEDT e 30 minutos após o tratamento com adenosina.

#### 6.4.1 Envolvimento do receptor A1

Com o objetivo de evidenciar a participação do receptor A1 de adenosina na ação antinociceptiva da LEDT, os animais foram pré-tratados com DPCPX (antagonista seletivo do receptor A1, 1 e 3 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.), 20 minutos antes do tratamento com a LEDT (390 mW, 20,8 J/cm<sup>2</sup>) ou adenosina (agonista não seletivo de receptores adenosinérgicos, 100 mg/kg, i.p.). A nocicepção aguda causado pelo cinamaldeído foi avaliada imediatamente após o tratamento com a LEDT e 30 minutos após o tratamento com adenosina.

#### 6.4.2 Envolvimento do receptor A2A

Com o objetivo de evidenciar a participação do receptor A2A de adenosina na ação antinociceptiva da LEDT, os animais foram pré-tratados com ZM-241385 (antagonista seletivo do receptor A2A, 3 e 10 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) 20 min antes do tratamento com a LEDT (390 mW, 20,8 J/cm<sup>2</sup>) ou adenosina (agonista não seletivo de receptores adenosinérgicos, 100 mg/kg, i.p.). A nocicepção aguda causado pelo cinamaldeído foi avaliada imediatamente após o tratamento com a LEDT e 30 minutos após o tratamento com adenosina.

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

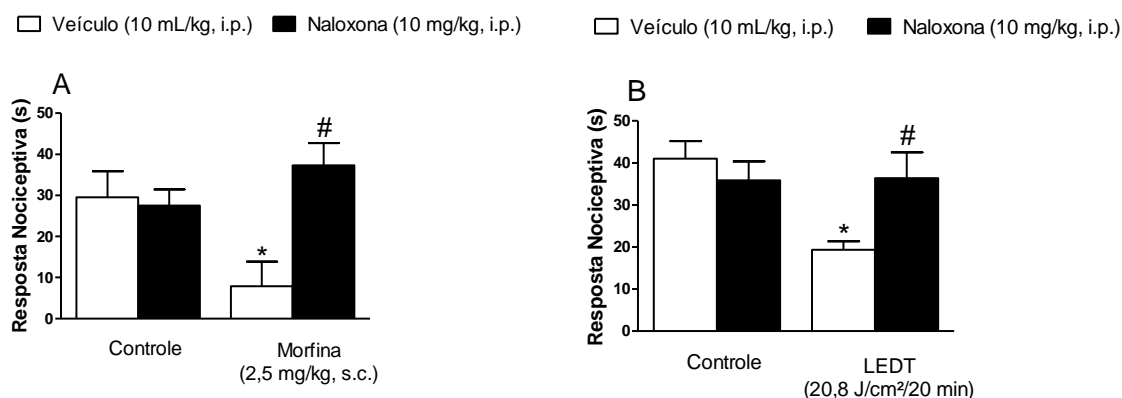
Para investigar o papel da via L-arginina/óxido nítrico no efeito antinociceptivo induzida pela LEDT, os animais foram pré-tratados com solução salina (10 ml/kg, i.p.) ou L-arginina (um precursor do óxido nítrico, 600 mg/kg, i.p.) e D-arginina (isômero inativo da L-arginina, 600 mg/kg), 20 minutos antes do tratamento com a LEDT (390 mW, 20,8 J/cm<sup>2</sup>) ou N $\omega$ -nitro-L-arginina (L-NOARG, um inibidor de óxido nítrico, 75 mg/kg, i.p.), tal como foi previamente descrito (SANTOS et al., 1999). A nocicepção aguda causado pelo cinamaldeído foi avaliada imediatamente após o tratamento com a LEDT e 30 minutos após o tratamento com L-NOARG.



## 7 RESULTADOS

### 7.1 Envolvimento opioidérgico

Os resultados apresentados na Figura 11 demonstram que o tratamento com a LEDT (390 mW, 20,8 J/cm<sup>2</sup>) e a morfina (2,5 mg/kg, s.c.), usada como controle positivo, reduziram a nocicepção causada pelo cinamaldeído, ( $p < 0,05$ ). Entretanto, a administração prévia de naloxona (10 mg/kg, i.p.) reverteu ( $p < 0,05$ ) o efeito analgésico da morfina e da LEDT, quando administrada por via intraperitoneal. A administração da naloxona não causou nenhum efeito per se na nocicepção induzida pelo cinamaldeído, quando comparado com o grupo que recebeu veículo.

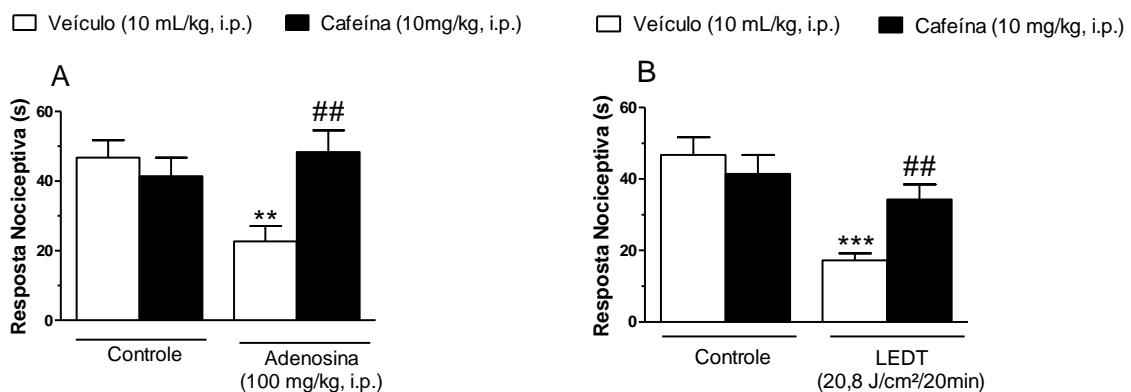


**Figura 11 – Envolvimento do sistema ópioide no efeito antinocicepção da LEDT**

Efeito da pré-administração de naloxona sobre a atividade antinociceptiva da LEDT (390 mW, 20,8 J/cm<sup>2</sup>) e da morfina (2,5 mg/kg, s.c.) sobre a atividade antinociceptiva da LEDT e morfina. Naloxona administrada por via intraperitoneal (10 mg/kg, i.p.). Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM, N = 8-10 animais. \* $p < 0,05$  indica diferença estatística entre o grupo tratado com morfina ou LEDT e grupo controle não tratado; # $p < 0,05$  entre morfina ou LEDT e tratamento naloxona. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Newman-Keuls.

## 7.2 Envolvimento do sistema Adenosinérgico

Os resultados apresentados na Figura 12 demonstram que o tratamento com a LEDT (390 mW, 20,8 J/cm<sup>2</sup>) e a adenosina (100 mg/kg, i.p.), utilizada como controle positivo, reduziram a nocicepção causada pelo cinamaldeído em camundongos ( $p < 0,001$  e  $p < 0,01$ ) e que tal efeito foi revertido pelo pré-tratamento dos animais com a cafeína (10 mg/kg, i.p.), tanto no efeito da LEDT como no da adenosina ( $p < 0,01$ ). A administração da cafeína não causou nenhum efeito per se na nocicepção induzida pelo cinamaldeído, quando comparado com o grupo que recebeu veículo.

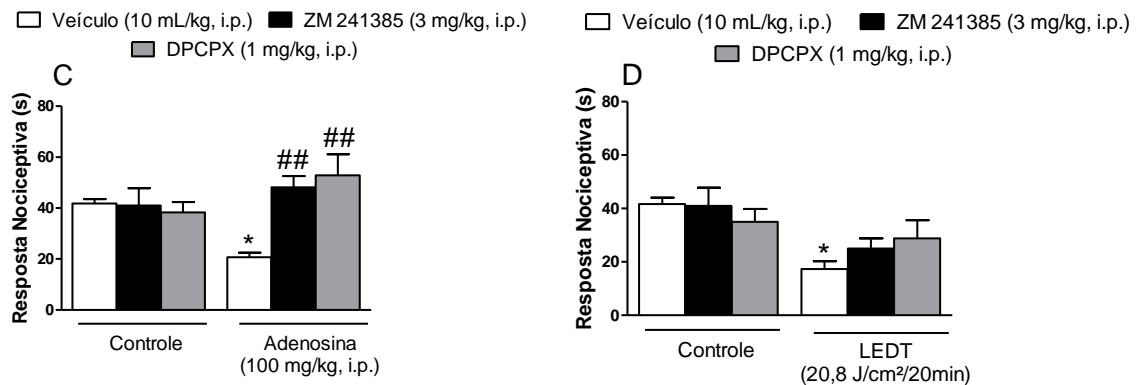


**Figura 12 – Envolvimento do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo da LEDT**

Efeito da pré-administração de cafeína (10 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva da LEDT (390 mW, 20,8 J/cm<sup>2</sup>) e da adenosina (100 mg/kg, i.p.) após o modelo do cinamaldeído. Cafeína administrada por via intraperitoneal. Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM, N = 8-10 animais. \*\* $p < 0,01$  indica diferença estatística em relação ao grupo controle não tratado com adenosina; ## $p < 0,01$  entre cafeína + adenosina e adenosina. \*\*\* $p < 0,001$  indica diferença estatística em relação ao grupo controle não tratado e tratamento com LEDT; ## $p < 0,01$  indica diferença estatística entre tratamento com LEDT e cafeína + tratamento. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Newman-Keuls.

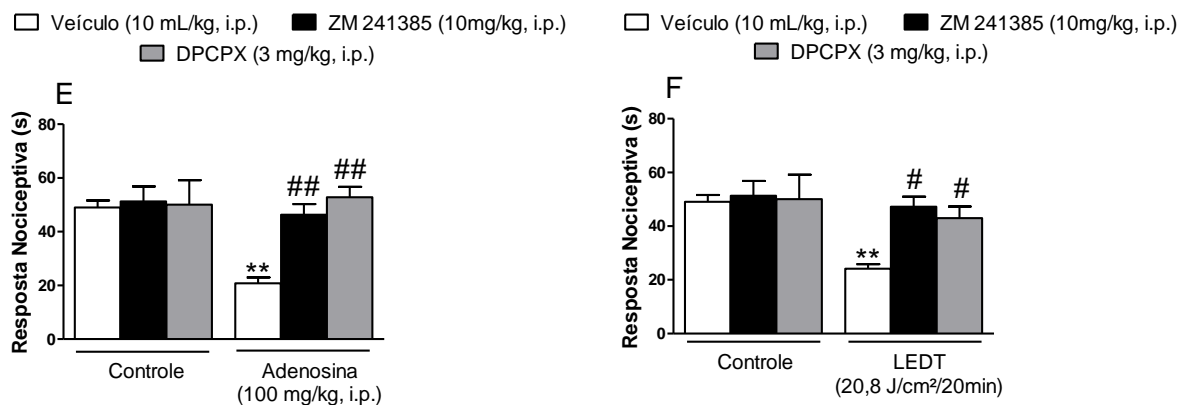
Os resultados apresentados na Figura 13 demonstram que o tratamento com a LEDT (390 mW, 20,8 J/cm<sup>2</sup>) e a adenosina (100 mg/kg, i.p.), utilizada como controle positivo, reduziram a nocicepção causada pelo cinamaldeído em camundongos ( $p < 0,05$ ), e que o pré-tratamento dos animais com DPCPX (1 mg/kg, i.p.) e ZM 241385 (3 mg/kg, i.p.), reverteram o efeito antinociceptivo da adenosina, ( $p < 0,01$ ) porém, não foram capazes de reverter o efeito antinociceptivo da LEDT. Entretanto, nas doses, 3 mg/kg de DPCPX e 10 mg/kg de ZM 241385 (Figura 14), houve a reversão do efeito antinociceptivo da adenosina e da LEDT

( $p < 0,001$  e  $p < 0,01$ ). A administração de DPCPX e do ZM 241385 não causaram nenhum efeito por se na nociceção induzida pelo cinamaldeído, quando comparado com o grupo que recebeu veículo.



**Figura 13 – Envolvimento dos receptores A1 e A2 a adenosinergicos no efeito antinociceptivo da LEDT**

Efeito da pré-administração de DPCPX (1 mg/kg, i.p.) e ZM 241385 (3 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva da LEDT (390 mW, 20,8 J/cm²) e adenosina (100 mg/kg, i.p.). Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM, N = 8-10 animais. \* $p < 0,05$  indica diferença estatística entre grupos tratados (LEDT ou adenosina) e o grupo controle não tratado; ## $p < 0,01$  indicam diferença estatística entre o tratamento (adenosina) e DPCPX + adenosina ou ZM 241385 + adenosina, respectivamente. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Newman-Keuls.

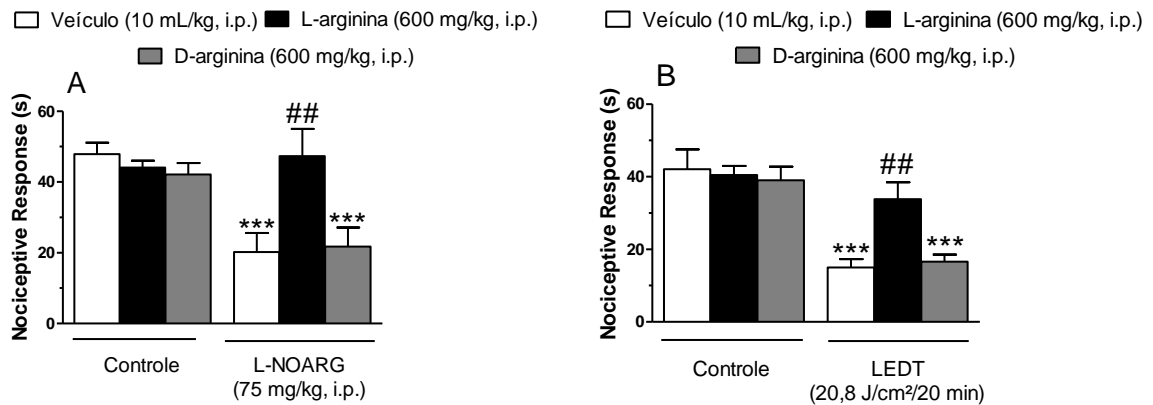


**Figura 14 – Envolvimento dos receptores A1 e A2 a adenosinergicos no efeito antinociceptivo da LEDT**

Efeito da pré-administração de DPCPX (3 mg/kg, i.p.) e ZM 241385 (10 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva da LEDT (390 mW, 20,8 J/cm²) e adenosina (100 mg/kg, i.p.). Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM, N = 8-10 animais. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  indica diferença estatística entre o grupo tratado com (LEDT ou adenosina) e o grupo controle não tratado, respectivamente; # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  indicam diferença estatística entre o tratamento (LEDT ou adenosina) e DPCPX + tratamento ou ZM 241385 + tratamento, respectivamente. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Newman-Keuls.

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

Os resultados apresentados na Figura 15 demonstram que o tratamento com a LEDT (390 W, 20,8 J/cm<sup>2</sup>) e com L-NOARG (75 mg/kg, i.p.), utilizada como controle positivo, reduziram a nocicepção causada pelo cinamaldeído (  $p < 0,0001$ ) e que tal efeito foi revertido de forma significativa ( $p < 0,001$ ) pela pré-administração sistêmica de L-arginina (600 mg/kg, i.p.) e não pela D-arginina (600 mg/kg, i.p.). A administração da L-arginina e da D-arginina não causaram nenhum efeito per se na nocicepção induzida pelo cinamaldeído, quando comparado com o grupo que recebeu veículo.



**Figura 15 – Envolvimento da via L-arginina/óxido nítrico no efeito antinociceptivo da LEDT**

Efeito da pré-administração de L-arginina (600 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva da LEDT e L-NOARG (390 mW, 20,8 J/cm<sup>2</sup>) e da L-NOARG (75 mg/kg, i.p.). Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM, N = 8-10 animais. \*\*\* $p < 0,0001$  indica diferença estatística entre grupos tratados (LEDT ou L-NOARG ou D-arginina) e o grupo controle não tratado; ## $p < 0,001$  indica diferença estatística entre o tratamento (LEDT ou L-NOARG ou D-arginina) e L-arginina. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Newman-Keuls.

## 8 DISCUSSÃO

Sabe-se que a prevalência da dor aguda é elevada e seu tratamento, um tema desafiador. Ela pode ser resultado de diversas condições, como dor pós-traumática, dor em emergências clínicas e dor pós-operatória que é uma das formas mais comuns de dor aguda. Durante esse tempo, o paciente pode experimentar efeitos sobre seu estilo de vida que podem limitar a execução de tarefas que anteriormente eram realizadas em seu cotidiano, requerendo o uso de analgésicos e podendo exigir um período de reabilitação (D'ARCY, 2011).

Devido a este problema, a procura por novas terapias complementares têm sido aplicada na melhoria da qualidade de vida de pacientes com dor e continua sendo um dos grandes alvos da medicina moderna. (DRAY, 2008). Recentemente várias pesquisas têm investigado os mecanismos subjacentes aos efeitos de diferentes terapias, como manipulação articular do tornozelo (MARTINS, 2012-2013); acupuntura (WARD, 2013), massagem terapêutica (MITCHINSON, 2009) e fototerapia (CIDRAL-FILHO et al., 2014). Com isso, essas terapias vêm recebendo um maior embasamento científico dando suporte para aplicação destas na clínica.

Os dados apresentados neste trabalho reforçam o seu uso na prática clínica, e demonstram que a LEDT apresenta um importante efeito antinociceptivo (analgésico). Além disso, ampliamos os possíveis alvos pelos quais a LEDT atuaria no controle da dor.

Essa discussão será apresentada em duas partes, (1º) resultados descritos no artigo: "Light-Emitting Diode (LED) phototherapy reduces nocifensive behavior induced by thermal and chemical noxious stimuli in mice: evidences for an involvement of capsaicin-sensitive central afferents fibers, (2º) dados adicionais obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Os resultados contidos no artigo demonstram que a LEDT apresentou efeito nociceptivo, nos testes da formalina, ácido acético, também foi efetivo na nocicepção induzida na administração de glutamato, cinamaldeído, capsaicina, mentol, salina acidificada, bradicinina, prostaglandina, PMA e forskolina. Além disso, demonstramos que o efeito antinociceptivo da LEDT envolve a participação de fibras C nociceptivas, bem como envolvimento opioide.

Inicialmente, o modelo da formalina foi utilizado para avaliar uma possível atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da LEDT. Neste mesmo modelo foi realizada a

padronização do tratamento, o qual visou avaliar qual seria o melhor efeito dose resposta. O teste da formalina (2,5%), considerado como um modelo clássico, pois é muito semelhante às respostas humanas à estímulos dolorosos, sendo este teste nociceptivo frequentemente usado para avaliar as respostas comportamentais à estimulação nociva através de uma resposta bifásica (WHEELER-ACETO; COWAN, 1991; TJOLSEN et al., 1992; ABBOTT et al., 1999). A primeira fase resulta de uma estimulação química direta sobre as fibras aferentes nociceptivas, principalmente fibras C, e pela liberação de substância P (HEAPY; JAMIESON; RUSSEL, 1987; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004; ALMEIDA et al., 2013). Por outro lado, a segunda fase está associada com o desenvolvimento de uma resposta inflamatória, através da liberação de mediadores algogênicos como prostaglandinas, serotonina, histamina e glutamato (MURRAY; PORRECA; COWAN, 1988; RUJJANAWATE; KANJANAPOTHI; PANTHONG, 1998; ALMEIDA et al., 2013) uma vez liberados ativam seus receptores específicos localizados no nociceptor. Os resultados deste estudo mostram que a LEDT resultou em um efeito antinociceptivo em ambas as fases do teste da formalina, uma vez que este envolve um grande número de mediadores. Posteriormente, investigamos em modelos específicos de nocicepção, possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito da LEDT.

Ainda, avaliamos o edema de pata induzido pela formalina, o qual é um modelo simples de inflamação aguda sub-crônica, sendo usado como teste inicial para avaliar agentes antiartríticos e anti-inflamatórios (GREENWALD, 1991). A LEDT mostrou um efeito inibitório no desenvolvimento do edema, confirmando assim, seu efeito antiedematogênico (ANDRADE et al., 2014).

Outra abordagem utilizada neste trabalho para investigar o efeito antinociceptivo da LEDT, foi o modelo do ácido acético (0,6 %), um modelo clássico de dor somato-visceral utilizado na triagem de terapias com potencial analgésico. A resposta nociceptiva ao ácido acético pode envolver uma estimulação direta das fibras aferentes pelo agente algogênico ou indiretamente, através de uma reação inflamatória aguda provocada pela liberação de mediadores endógenos como glutamato, serotonina, bradicinina e, principalmente, prostaglandinas, além de citocinas (COLLIER et al., 1968; RIBEIRO et al., 2000; IKEDA et al. 2001) que estimulam ou sensibilizam os neurônios nociceptivos resultando no comportamento de contorções abdominais (TRONGSAKUL et al., 2003). Além disso, a nocicepção no local da injeção também pode ser mediada pela dissociação de prótons os quais estimulam canais TRPV1 e ASICs, localizados nas fibras aferentes primárias (IKEDA, 2001; JULIUS; BASBAUM, 2001; COUTAUX et al., 2005). Este tipo de teste, embora considerado de baixa especificidade, apresenta uma alta sensibilidade e poder preditivo de eficácia clínica,

uma vez que as doses efetivas (DE50) obtidas em roedores geralmente são semelhantes às doses analgésicas em humanos (COLLIER et al., 1968; DUBINSKY et al., 1987; LE BARS et al., 2001). Neste modelo de nocicepção, a LEDT mostrou-se eficiente ao reduzir significativamente o número de contorções em todas as doses testadas.

Considerando os nossos resultados obtidos nos testes de formalina e do ácido acético, os quais possuem uma participação importante dos receptores glutamatérgicos, dos canais TRPA1, TRPV1, ASIC os quais são expressos em fibras do tipo C nociceptivas, investigamos o envolvimento destes no efeito antinociceptivo da LEDT.

Está estabelecido que o TRPA1 é um canal de cátions não seletivo, expresso nas fibras C e A $\delta$ , que também expressam TRPV1, o que demonstra uma possível interação funcional desses canais. De fato, 97% dos neurônios que expressam TRPA1 também expressam TRPV1, enquanto apenas 30% de fibras expressando TRPV1 também expressam TRPA1 (STORY et al., 2003; JULIUS, 2013). Estes são importantes para a excitação neuronal levando a liberação de neuropeptídeos inflamatórios e ao aumento da sensibilidade dolorosa. Ambos os canais também são ativados pela liberação de agentes inflamatórios a partir de células não neuronais (como queratinócitos, mastócitos, dentre outras) na área da lesão do tecido (HUANG; ZHANG; MCNAUGHTON, 2006; BAUTISTA; PELLEGRINO; TSUNOZAKI, 2013). Mcnamara e colaboradores (2007) ressaltam que o TRPA1 é o principal local onde a formalina interage para produzir a dor característica do teste, excitando neurônios sensoriais, desempenhando um papel muito importante na dor inflamatória juntamente com os canais TRPV1.

Considerando especificamente a importância dos TRPV1, TRPA1, TRPM8 e ASIC nos modelos investigados, o passo seguinte foi verificar o efeito da LEDT sobre a nocicepção induzida pela ativação seletiva destes canais.

Nossos resultados mostram que a LEDT reduziu o tempo em que os animais lambiam ou mordiam a pata injetada tanto com capsaicina, um potente ativador de receptores TRPV1, quanto com cinamaldeído (agonista TRPA1), indicando estes como um outro possível mecanismo de ação desta terapia. Adicionalmente investigamos o possível envolvimento de canais TRPM8 o qual, tem sido demonstrado importante para detecção do frio nocivo (CALIXTO et al., 2005). Nossos dados mostram que a LEDT reduz a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.pl. de mentol (agonista TRPM8). Juntos, esses dados evidenciam que a ação da LEDT é em parte pela redução da nocicepção induzida pela ativação de receptores TRPV1, TRPA1 e TRPM8.

Além disso, investigamos o efeito da LEDT na nocicepção induzida pela ativação de ASICs, estes estão envolvidos na transmissão nociceptiva, sobretudo em condições inflamatórias. Muitos estudos tem demonstrado que a expressão de ASICs é aumentada por mediadores pró-inflamatórios (MAMET et al., 2002) e, junto com o TRPV1 ativado, desempenham papéis complementares na sensibilização/ativação dos neurônios sensoriais por prótons (BAGGIO et al., 2012). No estudo em questão, a LEDT reduziu a nocicepção induzida pela salina acidificada. Este efeito indica que a inibição de canais ASICs é outro possível mecanismo de ação da LEDT.

Nossos resultados também mostram que a LEDT produz uma inibição significativa da resposta nociceptiva causada pela injeção intraplantar de glutamato. O glutamato é o principal neurotransmissor do SNC incluindo as vias nociceptivas, e possui um papel importante na transmissão nociceptiva periférica mediada por diferentes tipos de receptores (metabotrópicos ou ionotrópicos) (BEIRITH et al., 2002; MILLAN, 1999; FUNDYTUS, 2001). Assim, esse dado sugere que o efeito da LEDT pode ser em parte pela redução da transmissão glutamatérgica.

No modelo de nocicepção induzida no teste da placa quente, a LEDT mostrou aumento significativo no tempo de latência para lamber ou morder qualquer uma das patas posteriores; e demonstrou uma efetividade similar comparada à morfina, usada como controle positivo. Este modelo é comumente utilizado para a investigação de substâncias com efeito centrais frente a um estímulo agudo e não inflamatório, sendo sua ação influenciada por opioides (De AQUINO et al., 2013). Logo, a ação da LEDT, em prolongar a latência da resposta nociceptiva, indica sua habilidade em influenciar mecanismos centrais da dor.

Com o intuito de explorar o envolvimento das fibras sensíveis à capsaicina no efeito antinociceptivo da LEDT foi realizada a dessensibilização dos animais com capsaicina pela via intratecal os quais foram posteriormente submetidos ao modelo de formalina. Tal ensaio leva à ablação de grande parte dos terminais centrais das fibras C sensitivas à capsaicina. Os dados mostraram que a nocicepção induzida pela formalina é dependente de fibras C e que a dessensibilização alterou o perfil de ação da LEDT. Sugere-se, portanto, que a ação da LEDT em reduzir a resposta nociceptiva da formalina é dependente de fibras C.

Além destes sistemas clássicos de indução da dor, deve-se considerar ainda que a transmissão nociceptiva envolve vias de sinalização intracelulares, mediadas por segundos mensageiros (JULIUS; BASBAUM, 2001). Neste trabalho, nós investigamos o efeito da LEDT sobre a nocicepção induzida pela ativação das proteínas PKA e PKC.



A PKA constitui o principal alvo do AMPc, um dos segundos mensageiros intracelulares mais abundantes, esta por sua vez tem como alvo de fosforilação, canais iônicos (NMDA, GluR1 e TRPV1), proteínas associadas à liberação de neurotransmissores e transcrição gênica (SKALHEGG e TASKÉN, 1997; PINTO et al., 2008; TAYLOR et al., 2008). Estudos prévios demonstram que a nocicepção induzida por carragenina, formalina e ácido acético é revertida por inibidores ou deleção gênica de PKA e/ou PKC (MALMBERG et al., 1997; KHASAR et al., 1999).

A via de sinalização AMPc/PKA pode ser ativada por diferentes receptores (SKALHEGG e TASKÉN, 1997). Como exemplo, receptores E1 para prostanóides (EP1), são acoplados a proteína Gs que ativam a adenilato ciclase aumentando os níveis de AMPc, bem como administração exógena de forskolina (ativador da AC). Foi demonstrado que a ativação desta via pela administração de PGE2, está relacionada com a hipersensibilidade mecânica, que por sua vez é revertida por inibidores da PKA. (TAIWO e LEVINE, 1991; ALEY et al., 1999; MILLAN, 1999; KASSUYA et al., 2007; SACHS et al., 2009).

Além da PKA, outra cinase bastante envolvida no processamento nociceptivo é a PKC (SACHS et al., 2009). Uma vez ativada a PKC é capaz de fosfolilar componentes celulares como enzimas, canais iônicos de receptores (ex. TRPV1), e está relacionada aos efeitos nociceptivos causados por diversos mediadores, como a PGE2 (via receptores EP4), bradicinina, endotelinas e adrenalina ou por ativadores exógenos, como o PMA (ativador de PKC) (FERREIRA et al., 2005; SACHS et al., 2009). Alguns estudos demonstram que inibidores da PKC são capazes de reduzir a sensibilização de nociceptores causada por PGE2, bradicinina, carragenina e histamina (FERREIRA et al., 2005; FERREIRA; SILVA; CALIXTO, 2004; MEOTTI et al., 2006). Além disso, existe uma interação funcional entre os receptores B2 e os canais TRPA1, por um mecanismo dependente da ativação da PKA, dependente da liberação do  $Ca^{+2}$  intracelular. (LIEBMANN e BOHMER, 2000; WANG et al., 2008).

Considerando a importância da PKA e da PKC na transmissão nociceptiva e no desenvolvimento da hipersensibilidade, foi investigado na sequência, se o efeito antinociceptivo da LEDT poderia ser devido à modulação destas vias. Para tanto, foi utilizado o modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de ativadores das cascatas mediadas por PKA (PGE2 e FKC) e por PKC (BK, PMA). Como resultado, foi observado que o pré-tratamento com a LEDT foi capaz de prevenir a resposta nociceptiva pela PGE2, BK, FKC e PMA. Desta forma, os resultados apresentados sugerem que a LEDT pode exercer seu efeito antinociceptivo por modulação das vias da PKC e PKA.

Nesta segunda parte são apresentados os dados adicionais deste trabalho, na qual investigamos possíveis mecanismos de controle da dor, envolvidos no efeito da LEDT. Para tanto, escolhemos o modelo de nocicepção induzida pelo cinamaldeído (ativador de TRPA1), uma vez que neste, obtivemos a maior inibição, e ainda por apresentar ineditismo quanto ao efeito da LEDT no controle da dor mediada por este receptor.

Sabe-se que as sensações de dor podem ser modificadas por sistemas descendentes inibitórios endógenos, como por exemplo, os sistemas adrenérgicos, adenosinérgicos, serotoninérgico, opioide e canabinóide, via liberação de substâncias como noradrenalina, adenosina, serotonina, opioides e canabinóides endógenos, respectivamente. A ativação destes sistemas modifica a liberação de glutamato das fibras aferentes primárias e a liberação de GABA e glicina, alterando a transmissão da informação nociceptiva aos centros superiores e, desta forma, reduzindo a intensidade da percepção dolorosa (MILLAN, 2002; YOSHIMURA e FURUE, 2006).

Dadas as semelhanças entre a LLLT e a LEDT, e com base no fato de que analgesia induzida pela LLLT é codificada por, entre outras substâncias endógenas, peptídeos opioides (PERES; SERRA; ASHMAWI, 2010; HONMURA et al., 1993; FERREIRA et al., 2005; HAGIWARA et al., 2008) assim como pelo óxido nítrico (NO) (HUANG et al., 2004; MORIYAMA et al., 2005; 2009; GOMES; DALMARCO; ANDRE, 2012; SONG; ZHOU; CHEN, 2012), o passo seguinte foi investigar no modelo de nocicepção aguda induzida pelo cinamaldeído, a possível participação do sistema opioidérgico e adenosinérgico assim como a participação da via L-arginina/óxido nítrico, no efeito da LEDT. O presente estudo mostrou que o sistema opioidérgico parece estar envolvido na ação antinociceptiva da LEDT. Isso pode ser demonstrado pelo fato de que o pré-tratamento dos animais com naloxona, antagonista não seletivo de receptores opioides, foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da LEDT, assim como da morfina, agonista não seletivo de receptores opioides, respectivamente. Assim, esse dado está de acordo com o resultado de Cidral-Filho e colaboradores (2014), onde demonstraram que a atividade anti-hiperalgésica induzida pela LEDT 950 nm é mediada por receptores opioides.

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

Sabe-se que diversos agentes podem alterar a disponibilidade extracelular de adenosina e subsequentemente diminuir a transmissão da dor (NASCIMENTO, 2010),

incluindo o tratamento com terapias integrativas, tal como a acupuntura (GOLDMAN et al., 2010; BARCALA, 2014). Não há dados na literatura sobre o envolvimento do sistema adenosinérgico nos efeitos analgésicos da LLLT, entretanto, Cidral e colaboradores (2013), demonstraram no modelo de incisão plantar, a participação do sistema adenosinérgico no efeito analgésico da LEDT.

O presente estudo mostrou que o sistema adenosinérgico também parece estar envolvido na ação antinociceptiva da LEDT. Isso pode ser demonstrado pelo fato de que o pré-tratamento dos animais com cafeína, antagonista não seletivo de receptores adenosinérgicos, foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da LEDT, assim como da adenosina, agonista não seletivo de receptores adenosinérgicos. Além disso, o efeito analgésico da LEDT envolve a participação específica de receptores A1 e A2A em nível periférico. Isso pode ser demonstrado pelo pré-tratamento dos animais com DPCPX (antagonista seletivo de receptor A1) e ZM 241385 (antagonista seletivo de receptor A2A), reverteram o efeito antinociceptivo da LEDT. Sabe-se que o receptor A1 medeia analgesia, enquanto o A2A facilitava a transmissão nociceptiva na periferia. Entretanto, a ativação do receptor A2A, induz um aumento da produção de AMPc (que pode induzir dor) e também à abertura de canais de  $K^+$  (que pode reduzir a dor) (SAWYNOK, 1998; REGAYA, PHAM et al., 2004; JACOBSON; GAO, 2006). Os mecanismos exatos por meio dos quais a LEDT exerce seu efeito analgésico via receptores adenosinérgicos A1 e A2A precisam ser ainda elucidados, principalmente para explicar precisamente como o receptor A2A atua em determinadas situações e tipos de dor, uma vez que ele também pode ser útil em futuras abordagens clínicas.

Além disso, sabe-se que os agonistas opioides podem estimular o sistema adenosinérgico, por exemplo, a administração de morfina pode estimular receptores opioides espinhais a efetuar a liberação de adenosina que, por sua vez, atua em receptores adenosinérgicos induzindo analgesia. De fato, consequências relevantes das interações entre adenosina e os opioides podem ser observadas no controle da dor neuropática (RIBEIRO; SEBASTIÃO, 2009). Este fato também foi demonstrado em humanos (EISENACH et al., 2004), em que voluntários saudáveis recebiam injeção intratecal de morfina e foi demonstrado aumento das concentrações de adenosina na medula espinal. Uma vez que a liberação de adenosina induzida pela morfina contribui para o controle da dor, devido às ações antinociceptivas, a diminuição na liberação de adenosina, neste caso, pode explicar a diminuição da eficácia e potência de opioides como, por exemplo, no tratamento da dor neuropática (RIBEIRO; SEBASTIÃO, 2009).

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

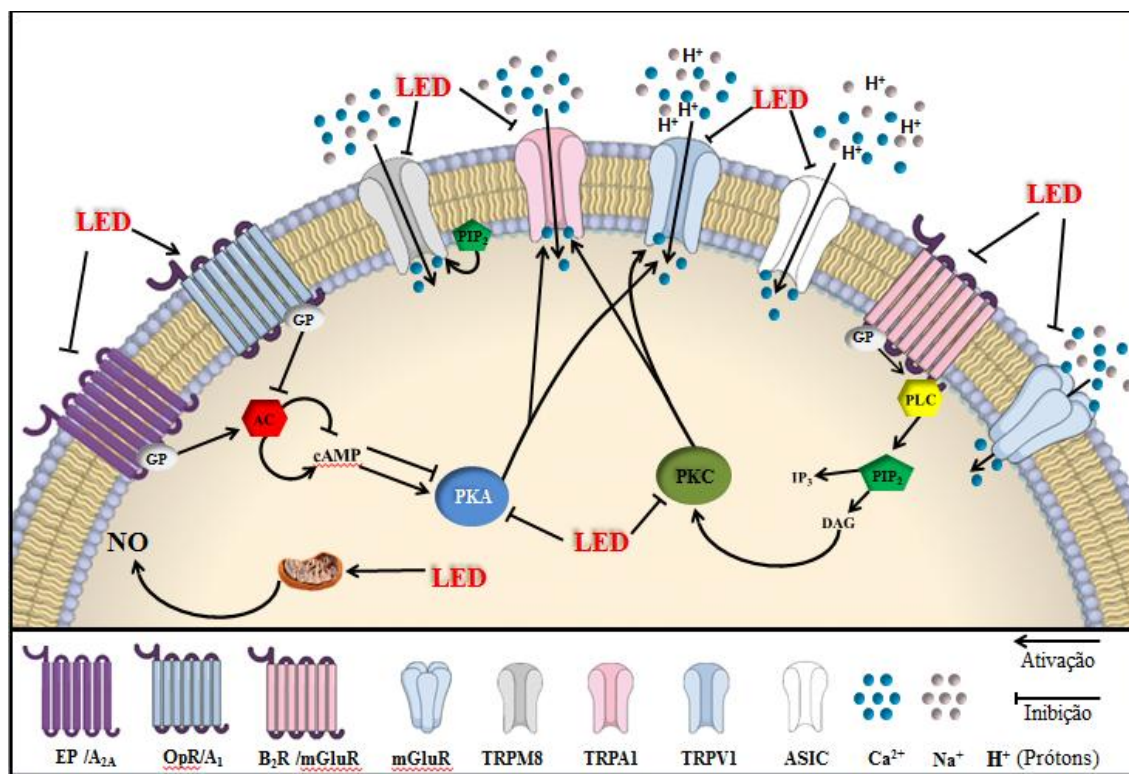
Por outro lado, outras moléculas sinalizadoras participam da transmissão nociceptiva, entre elas o NO, um gás neuroativo capaz de modular canais iônicos, desempenhando assim um papel importante em estados agudos e crônicos de dor, tanto a nível central como periférico. Recentemente foi demonstrado que o NO foi capaz de ativar os receptores TRPV1, TRPA1 e TRPM8, canais de íons polimodais que detectam estímulos nocivos, presentes em nociceptores periféricos (MALKIA et al., 2007; MIYAMOTO et al., 2009).

Muitos estudos demonstram que a terapia fotônica de baixa intensidade reduz a expressão de NO de uma forma dependente da dose (MORIYAMA et al., 2009; GOMES; DALMARCO; ANDRE, 2012; HUANG; LU; KAO, 2012; SONG et al., 2012). Em consonância com estes dados, os resultados aqui apresentados sugerem que um dos mecanismos possíveis da analgesia induzida pela LEDT, seja a diminuição dos níveis de NO no processo inflamatório, uma vez que o efeito da LEDT foi prevenido pela pré-administração de L-arginina. Os resultados aqui obtidos confirmam tal hipótese, uma vez que a administração de L-NOARG (inibidor da enzima NO sintase) reduziu a nocicepção induzida pelo cinamaldeído em camundongos, e que a pré-administração sistêmica de L-arginina (um precursor do NO) previne este efeito. Adicionalmente, realizamos um ensaio com a D-arginina (isômero inativo da arginina) e verificamos que não houve a prevenção do efeito antinociceptivo da LEDT, indicando a participação desta sobre a via L-arginina/NO. Da mesma forma, resultados do nosso laboratório, Cidral-Filho e colaboradores (2014) demonstraram no modelo de dor pós-operatória, que o pré-tratamento com L-arginina reverteu o efeito antinociceptivo da LEDT.

Embora não investigado diretamente no modelo de dor pós-operatória, a LEDT apresentou atividade antinociceptiva em modelos agudos, como a dor induzida pelos mediadores inflamatórios, prostaglandina, bradicinina, dor induzida por agonistas de TRPA1, TRPV1, TRPM8, ASIC e glutamato, os nossos dados sugerem que o efeito antinociceptivo da LEDT envolva a inibição na transmissão nociceptiva produzida pelos receptores e canais avaliados.

Coletivamente, os resultados apresentados demonstram que a emissão de luz por diodo possui importante efeito antinociceptivo em modelos agudos, com envolvimento inflamatório, e tal efeito parece ser mediado por interação com canais TRPA1, TRPV1, TRPM8 e ASIC, e com a via de sinalização AMPc/PKA e PLC/PKC, além da participação

glutamatérgica, opioidérgica, adenosinérgica e da via L-arginina/óxido nítrico, conforme ilustrado na Figura 16. Tais resultados evidenciam o uso da LEDT na terapêutica e reforçam seu uso na prática clínica.



**Figura 16 – Representação esquemática dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo da LEDT**

O esquema representa um terminal nociceptivo com diversos receptores, os quais podem ser ativados por diferentes estímulos (térmicos, químicos ou mecânicos). Tais estímulos podem ativar o nociceptor através de canais iônicos (TRPs, ASICs, gluR), GPCRs (pela via de sinalização PLC/PKC e/ou AC/AMPC/PKA) e RTKs, promovendo assim a nocicepção. Por outro lado, o pré-tratamento com a LEDT mostrou-se na prevenção da resposta à diferentes estímulos álgicos, e esse efeito parece estar envolvido na via PKA/AMPC e PLC/PKC, e da L-arginina/NO, bem como favorece a ativação da via inibitória da dor a partir do sistema opioide e adenosinérgico.

Fonte: Elaborado pela autora (2015); Criação e arte por Leandro Flores do Nascimento (2015).

## 9 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que a LEDT, aplicada sistemicamente, apresentou os seguintes efeitos:

- Através do modelo da formalina, observou-se que a LEDT reduziu o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata após a injeção do agente álgico, na fase neurogênica e na fase inflamatória;

- Redução no edema de pata induzido pela injeção i.pl. de formalina, evidenciando um efeito anti-inflamatório local;

- Atividade antinociceptiva no modelo do ácido acético (reduziu o número de contorções abdominais);

- A LEDT pode estar atuando através da inibição glutamatérgica, uma vez que preveniu a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.pl. de glutamato;

- A LEDT pode estar atuando através de receptores TRPA1/TRPV1/TRPM8/ASICs uma vez que reduziu o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata após a injeção i.pl. de cinamaldeído, capsaicina, mentol e salina ácida, respectivamente;

- A inibição da via de sinalização PGE2/BK/PKC/PKA pode estar envolvida no mecanismo antinociceptivo da LEDT;

- Aumentou a latência de retirada da pata no teste de placa quente, possivelmente evidenciando uma ação central;

- Além disso, foi demonstrado que o efeito antinociceptivo da LEDT depende da integridade de fibras aferentes primárias sensíveis a capsaicina.

- Os efeitos antinociceptivos da LEDT são mediados por interação dos principais sistemas endógenos de controle descendente da dor – o sistema opióide, adenosinérgico e a via L-arginina/óxido nítrico.

Em conjunto, os dados obtidos no presente estudo fornecem evidências científicas que suportam o uso na prática clínica da luz por diodo infravermelho, e a investigação além de alguns dos seus mecanismos neurofisiológicos contribuem para o seu potencial terapêutico e para continuidade de estudos pré-clínicos aprofundados.

## REFERÊNCIAS

ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B. J.; WESTBROOK, R. F. The formalin test: scoring properties of first and second phases of pain response in rats. **Pain**, 60:91-102, 1995.

ABRAMOVITS, W.; ARRAZOLA, P.; GUPTA, A. K. Light-Emitting Diode Based Therapy. **Derm Clin**, p. 38-40, 2005.

AGNE, J. E. **Eu sei eletroterapia**. Santa Maria: Pallotti, 2009.

AKOPIAN, A. N. Regulation of the nociceptive transmission at the periphery via TRPA1-TRPV1 interactions. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 12: 89-94, 2011.

ALEY, K. O.; MARTIN, A.; McMAHON, T.; MOK, J.; LEVINE, J. D.; MESSING, R. O. Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. **The Journal of Neuroscience**, 21: 6933-6939, 2001.

ALMEIDA, J. R. G. S. et al. Borneol, a Bicyclic Monoterpene Alcohol, Reduces Nociceptive Behavior and Inflammatory Response in Mice. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-5, 2013.

ANDRADE-NADUR, N. et al. Photobiostimulation reduces edema formation induced in mice by Lys-49 phospholipases A2 isolated from Bothrops moojeni venom. **Photochem. Photobiol. Sci.**, 13, 1561, 2014.

ARVIDSSON, U. et al. Delta-opioid receptor immunoreactivity: distribution in brainstem and spinal cord, and relationship to biogenic amines and enkephalin. **Journal of Neuroscience**, v. 15(2), p. 1215-1235, 1995a.

ARVIDSSON, U. et al. Distribution and targeting of mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. **Journal of Neuroscience**, v. 15(5), p. 3328-3341, 1995b.

ASSIS, L. et al. Low level laser therapy (880 nm) reduces inflammatory response and oxidative stress in rats tibialis anterior muscle after cryolesion, **Lasers Surg. Med.**, 44(9), 726-735, 2012.

BAGGIO, C. H. et al. Antinociception of b-D-glucan from *Pleurotus pulmonarius* is possibly related to protein kinase C inhibition. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 872-877, 2012.

BALDO, M. V. C. Somestesia. In: AIRES, M. M. et al. **Fisiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1999.

BARCALA, T. S. **Efeito antinociceptivo da estimulação manual do acuponto gb34 (yanglingquan) no modelo experimental de dor muscular de início tardio em camundongos**, 85f. Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em neurociências, Florianópolis, 2014.

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

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

BASBAUM, A. I.; JESSEL, T. M. The perception of pain. In: KANDEL, E. R.; SCHARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. (eds). **Principles of neural science**. 4. ed. New York: McGraw-Hill, p. 472-491, 2000.

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

BASSO, F. G. et al. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. **Lasers Med Sci**, in press, 2012.

BASTIA, E. et al. Effects of A(1) and A(2A) adenosine receptor ligands in mouse acute models of pain. **Neurosci Lett**, v. 328, n. 3, Aug 16, p. 241-4. 2002.

BAUTISTA, D. M.; PELLEGRINO, M.; TSUNOZAKI, M. TRPA1: A gatekeeper for inflammation. **Annu Rev Physiol**; 75:181-200, 2013.

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

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

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neuroscience, exploring the brain**. New York: Williams & Wilkins Publishers, p. 340-345, 1996.

BEIRITH, A. et al. Study of the antinociceptive action of the ethanolic extract and the triterpene 24-hydroxytormentonic acid isolated from the stem bark of *Ocotea suaveolens*. **Planta Médica**, 65: 50-55, 1999.

BENARROCH, E. E. Descending monoaminergic pain modulation: bidirectional control and clinical relevance. **Neurology**. v. 71, n. 3, p. 217-221, 2008.

BESSION, J. M. The neurobiology of pain. **The Lancet**, v. 353(9164), p. 1610-15, 1999.

BESSION, P.; PERL, E. R. Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. **Journal of Neurophysiology**, v. 32, p. 1025-1043, 1969.

BONICA, J. J.; BALLANTYNE, J. C.; RATHMELL, J. P. **The Management of Pain**. Philadelphia, Lea &Febiger, 1953:25.

BURGESS, P. R.; PERL, E. R. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **Journal of Physiology**, v. 190(3), p. 541-562, 1967.

BURNSTOCK, G. et al. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. **Prog Neurobiol**, v. 95, n. 2, Oct, p. 229-74. 2011.



BY, Y. et al. Intracerebroventricular injection of an agonist-like monoclonal antibody to adenosine A(2A) receptor has antinociceptive effects in mice. **J Neuroimmunol.** Jan; 230(1-2):178-82, 2011.

CAIRNS, B. E. Peripheral receptor targets for analgesia: novel approaches to pain treatment. **Hoboken, N. J.:** Wiley. xiii, 541 p., [8] p. of plates p, 2009.

CALIXTO, J. B.; KASSUYA, C. A. L.; ANDRÉ, E.; FERREIRA, J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels Family and their function. **Pharmacology & Therapeutics**, 106: 179-208, 2005.

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

CARRUTHERS, A. M. et al. Adenosine A(1) receptor-mediated inhibition of protein kinase A-induced calcitonin gene-related peptide release from rat trigeminal neurons. **Mol Pharmacol**, v. 59, n. 6, Jun, p. 1533-41. 2001.

CHANG, P. C. et al. Irradiation by light-emitting diode light as na adjunct to facilitate healing of experimental periodontitis in vivo. **J Periodontal Res**, Jul 29, 2012.

CHAPMAN, C. R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **The Lancet**, v. 353(9171), p. 2233-2237, 1999.

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

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

CIDRAL-FILHO et al. 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 Med Sci** 29:695-702, 2014.

CIDRAL-FILHO. **Avaliação dos mecanismos fotobiológicos envolvidos na antinociceção induzida pela terapia por diodo emissor de luz em camundongos.** 149f. Tese (doutorado)-Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós graduação em neurociências, Florianópolis, 2013.

COLLIER, H. O. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, p. 295-310, 1968.

CORAZZA, A. V. et al. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. **Photomed Laser Surg. Apr**; 25(2):102-6, 2007.

CORTRIGHT, D. N.; KRAUSE, J. E.; BROOM, D. C. TRP channels and pain. **Biochimica et Biophysica Acta** 1772: 978-988, 2007.

COSTA, J. M. et al. Tratamiento de 15 casos de dolor crónico con um equipo de fotopuntura por diodos emisores de luz roja (617 nm). **Revista Internacional de Acupuntura**, v. 2, n. 1, p. 63-66, Jan./Mar., 2008.

COSTA, J. M.; CORRAL-BAQUES, M. I.; AMAT, A. Acupuncture: A first approach on pain relief using a 617 nm led device. **Proc. of SPIE**. v. 6428, 2007.

COUTAUX, A. et al. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint, bone, spine: revue du rhumatisme**, v. 72, n. 5, p. 359-371, 2005.

CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems – cyclic AMP and cyclic GMP – on inflammatory hyperalgesia. **Brazilian Journal of Pharmacology**, 127: 671-678, 1999.

CUNHA, R. A. et al. Potential therapeutic interest of adenosine A2A receptors in psychiatric disorders. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 15, p. 1512-24. 2008.

CUNHA, R. A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A. **Purinergic Signaling**. 2005 June; 1(2): 111–134.

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

DA SILVA, L.; CARVALHO, E.; CRUZ, M. T. Role of neuropeptides in skin inflammation and its involvement in diabetic wound healing. **Expert Opin Biol Ther**, 10(10): 1427-39, 2010.

D'ARCY, I. **Compact Clinical Guide to Acute Pain Management: An Evidence-Based Approach for nurses**. Springer publishing company, 2011.

DE AQUINO, A. B. et al. The Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae). **Hindawi Publishing Corporation**, v. 218627, p. 1-8, 2013.

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

DEVAL, E. et al. Acid-sensing ion channels in postoperative pain. **J Neurosci**. Apr 20;31(16):6059-66, 2011.

DHAWAN, B. N. et al. Classification of opioid receptors. **Pharmacological Review**, v. 48(4), p. 567-592, 1996.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, p. 125-131, 1995.

DRAY, A. Neuropathic pain: emerging treatments. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 48-58, jul. 2008.

DUBINSKY, B. et al. The antialgesic drugs: human therapeutic correlates of their potency in laboratory animal models of hyperalgesia. **Agents and Actions**. 20: 50-60, 1987.

DUNWIDDIE, T. V.; MASINO, S. A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 31-55. 2001.

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

EISENACH, J. C. et al. Intrathecal but not intravenous opioids release adenosine from the spinal cord. **J Pain**, Feb;5(1):64-8, 2004.

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

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

ESPLUGUES, J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system, **Br. J. Pharmacol.** 135 (2002) 1079-1095.

FEIN, A. **Nociceptores: as células que sentem dor**. Ribeirão Preto – SP: Dor On Line; 106 p, 2011.

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

FERREIRA, J. et al. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase a activation in mice. **Pain**, 117: 171-181, 2005.

FERREIRA, J.; SILVA, G. L.; CALIXTO, J. B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. **British Journal of Pharmacology**, 141: 787-794, 2004.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I.; HEINRICHER, M. M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMahon S, Koltzenburg M, eds. **Textbook of Pain** 5th ed. Burlington, Massachusetts, USA: Elsevier Health Sciences;:125–142, 2005.

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

FISHMAN, S. M. **Bonica's Management of Pain**, 4. ed., Editora Llw, Canada, 2012.

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

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

FREDHOLM, B. B. Adenosine a physiological or pathophysiological agent? **J Mol Med.** (Berl). Mar;92(3):201-6. doi: 10.1007/s00109-013-1101-6. Epub 2013 Dec 22, 2014

FUNDYTUS, M. E. Glutamate receptors and nociception: Implications for the drug treatment of pain. **CNS Drugs**. v. 15, p. 29-58. 2001.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v. 48(2), p. 129-141, 1999.

GAO, X.; XING, D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. **J Biomed Sci**. 16(1): 4, 2009.

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

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

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

GREENWALD, R. A. Animal models for evolution of arthritic drug. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 13, p. 75-83, 1991.

GRICHNIK, K. P.; FERRANTE, F. M. **The difference between acute and chronic pain.** Mt Sinai J Med. May;58(3):217-20,1991

GRIFFIS, C. A.; COMPTON, P.; DOERING, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. **Biological Research Nursing**, v. 7(4), p. 297-312, 2006.

GUIEU, R. et al. Adenosine and Clinical Forms of Neurally-Mediated Syncope. **J Am Coll Cardiol**. Jul 14;66(2):204-5, 2015

GUIEU, R. et al. Adenosine and the nervous system: clinical implications. **Clin Neuropharmacol**, v. 19, n. 6, Dec, p. 459-74. 1996.

GUTSTEIN, H. B. et al. Mu and Kappa receptors in periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. **Neuroreport**, v. 9(8), p. 1777-81, 1998.

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

HARLAN, E. S.; ELIZABETH, A. L. Comparison of the peripheral and central effects of the opioid agonists loperamide and morphine in the formalin test in rats. **Neuropharmacology**, v. 4(2), p. 253-261, 2002.

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

HEAPY, C. G.; JAMIESON, A.; RUSSEL, N. J. W. Afferent C-fibres and A delta activity in models of inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 90, p. 164-170, 1987.

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

HODGSON, B. D. et al. Amelioration of oral mucositis pain by NASA near-infrared light-emitting diodes in bone marrow transplant patients. **Support Care Cancer**, v. 20, n. 7, p. 1405-15, Jul 2012.

HOFFMAN, B. B.; TAYLOR, P. Neurotransmissão: Os sistemas nervosos autônomo e motor somático. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. Goodman & Gilman: **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 89-117, 2003.

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

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

HUANG, J.; ZHANG, X.; MCNAUGHTON, P. A. Modulation of temperature-sensitive TRP channels. **Seminar in Cell & Developmental Biology** 17: 638-645, 2006.

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

IKEDA, Y. et al. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v. 69, p. 2911-2919, 2001.

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

JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 29, 355-384 2013.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413(6852), p. 203-210, 2001.

KARU, T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. **Photomed Laser Surg.** 28: 159-160, 2010.

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

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

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

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; KOLYAKOV, S. F.; AFANASYEVA, N. I. Absorption measurements of cell monolayers relevant to mechanisms of laser phototherapy: reduction or oxidation of cytochrome c oxidase under laser radiation at 632.8 nm. **Photomed Laser Surg**, 26(6): 593-9, 2008.

KASSUYA, C. A. L. et al. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. **British Journal of Pharmacology**. 150: 727-737, 2007.

KHASAR, S. G. et al. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C mutant mice. **Neuron** 24: 253-260, 1999.

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

LAZARUS, M. et al. Arousal effect of caffeine depends on adenosine A2A receptors in the shell of the nucleus accumbens. **J Neurosci**. Jul 6;31(27):10067-75, 2011.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception.

LEVY, D.; STRASSMAN, A. M. Distinct sensitizing effects of the cAMP-PKA second messenger cascade on rat dural mechanonociceptors. **Journal of Physiology** 538: 483-493, 2002

LIEBMANN, C.; BÖHMER, F. D. Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signaling. **Current Medicinal Chemistry** 7: 911-943, 2000.

LIMA, F. O. et al. Direct blockade of inflammatory hypernociception by peripheral A1 adenosine receptors: involvement of the NO/cGMP/PKG/KATP signaling pathway. **Pain**, v. 151, n. 2, Nov, p. 506-15. 2010.

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

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

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

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353(9164), p. 1607-1609, 1999.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. **Pain** 137: 473-477, 2008.

LORD, J. A. et al. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. **Nature**, v. 267(5611), p. 495-99, 1977.

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

LYNCH, M. E. A. J.; CLARK et al. Intravenous adenosine alleviates neuropathic pain: a double blind placebo controlled crossover trial using an enriched enrolment design. **Pain**, v. 103, n. 1-2, May, p. 111-7. 2003.

MACINTYRE, P. E; SCHUG, S. A. **Acute Pain Management: A Practical Guide**, Fourth Edition. December 4, 2014.

MALATYNSKA, E. Anhedonic-like traits and lack of affective deficits in 18-month-old C57BL/6 mice: Implications for modeling elderly depression. **Experimental Gerontology**, v. 47, p. 552-564, 2012.

MALKIA, A. et al. Bidirectional shifts of TRPM8 channel gating by temperature and chemical agents modulate the cold sensitivity of mammalian thermoreceptors. **J Physiol** 581: 155-174, 2007.

MALMBERG, A. B. et al. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP- dependent protein kinase. **The Journal of Neuroscience** 17: 7462-7470, 1997.

MAMET, J. et al. Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 10662-10670, 2002.

MARCHAND, F.; PERRETI, M.; McMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience** 6: 521-532, 2005

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

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

McMAHON, S. B.; CAFFERTY, W. B. J.; MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Experimental Neurology** 192: 444-462, 2005.

McNAMARA, C. R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 104: 13525-13530, 2007.

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

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

MEOTTI, F. C. et al. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 316: 789-796, 2006.

MERSKEY, H. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Pain**, v. 3, p. S1-S226, 1986.

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

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

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

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology** 66: 355-474, 2002.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57(1), p. 1-164, 1999.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nature Reviews. Neuroscience**. v. 10, n. 1, p. 23-26, 2009.

MITCHINSON, A. R. et al. Acute postoperative pain management using massage as an adjuvant therapy: a randomized trial. **Arch Surg** 142(12):1158-1167, 2007.

MIYAMOTO et al. TRPV1 and TRPA1 Mediate Peripheral Nitric Oxide-Induced Nociception in Mice. **PLoS ONE** 4(10): e7596, 2009.

MONTELL, C. The TRP superfamily of cation channels. **Science's STKE** 272: re3, 2005.

MOORE, D. N. In search of an ideal analgesic for common acute pain. **Acute Pain** 11, 129-137, 2009.

MORAIS, N. C. et al. Anti-inflammatory effect of low-level laser and light-emitting diode in zymosan-induced arthritis. **Photomed Laser Surg**. v. 28, n. 2, p. 227-32, 2010.

MORAN, M. M. et al. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**. 10: 601- 620, 2011.

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

MORIYAMA, Y. et al. In vivo study of the inflammatory modulating effects of low-level laser therapy on iNOS expression using bioluminescence imaging. **Photochem Photobiol**, v. 81, n. 6, p. 1351-5, Nov-Dec 2005.

MUÑOZ-ABELLÁN, C.; ARMARIO, A.; NADAL, R. Do odors from different cats induce equivalent unconditioned and conditioned responses in rats? **Physiology & Behavior**, v. 99, p. 388-394, 2010.

MURRAY, C. W.; PORRECA, F.; COWAN, A. Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 20, p. 175-186, 1988.

NAKAMURA, M. et al. Investigation of chronic musculoskeletal pain (third report): with special reference to the importance of neuropathic pain and psychogenic pain. **Journal of orthopaedic science**, v. 19, n. 4, p. 667-75, 2014.



NASCIMENTO, F. P. et al. Inosine Reduces Pain-Related Behavior in Mice: Involvement of Adenosine A1 and A2A Receptor Subtypes and Protein Kinase C Pathways. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, 334:590-598, 2010.

NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTICS, 2010. FastStats: Inpatient Surgery. **Centers for Disease Control and Prevention - CDC**, USA. [http://www.cdc.gov/nchs/fastats/inpatient\\_surgery.htm](http://www.cdc.gov/nchs/fastats/inpatient_surgery.htm).

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

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

OLSON, N.; VAN DER VLIET, A. Interactions between nitric oxide and hypoxiainducible factor signaling pathways in inflammatory disease, **Nitric Oxide**, 12.010, 2011.

ONOFRE et al. **Dor: Princípios e Prática**. ARTMED, 2. ed. Brasil, 2009.

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

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. **Central modulation of pain**. **The Journal of Clinical Investigation**. v. v. 120, n. 11, p. 3779-2787, 2010.

OTUKI, M. F. et al. Antinociceptive properties of mixture of -amyrin and -amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 313: 310-318, 2005.

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

PERTOVAARA, A. Noradrenergic pain modulation. **Progress in Neurobiology**. v. 80, n. 2, p. 53-83, 2006.

**Pharmacological Reviews** 53: 597-652, 2001.

PIGATTO et al. Estudo da emissão de luz por diodo infravermelho na dor neuropática em ratos. **Fisioterapia Brasil**. v. 14, n. 4, julho/agosto de 2013.

PINTO, L. G. et al. Evidence for the involvement of glutamatergic and GABAergic systems and protein kinase A pathway in the antinociceptive effect caused by p-methoxy-diphenyl diselenide in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 88: 487-496, 2008.

PIRES, D. et al. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. **Lasers Med Sci**, 26(1): 85-94, 2011.

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

PREMKUMAR, L. S.; ABOOJ, M. TRP channels and analgesia. **Life Sci**. 2012.

PROVÉRIBIOS: In: **A Bíblia: Revista e corrigida**, Sociedade Bíblica do Brasil, Barueri, 2012.

QU, X.; COONEY, G. et al. Short-term metabolic and haemodynamic effects of GR79236 in normal and fructose-fed rats. **Eur J Pharmacol**, v. 338, n. 3, Nov 12, p. 269-76. 1997.

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

REGAYA, I. T.; PHAM et al. Small conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels, SkCa, but not voltage-gated K<sup>+</sup> (K<sub>v</sub>) channels, are implicated in the antinociception induced by CGS21680, a A<sub>2A</sub> adenosine receptor agonist. **Life Sci**, v. 76, n. 4, Dec 10, p. 367-77. 2004.

RIBEIRO, J. A. et al. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. **Prog Neurobiol**, v. 68, n. 6, Dec, p. 377- 92. 2002.

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A. M. Caffeine and adenosine. **J Alzheimers Dis**.;20 Suppl 1:S3-15. doi: 10.3233/JAD-2010-1379, 2010.

RIBEIRO, R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, p. 111-118, 2000.

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

RUJJANAWATE, C.; KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A. Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 91-95, 2003.

RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**, v. 49, p. 123-33, 1998.

SACHS, D. et al. The role of PKA and PKC pathways in prostaglandin E<sub>2</sub>-mediated hypernociception. **British Journal of Pharmacology**. 156: 826-834, 2009

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

SANTOS, A. R. S. et al. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 289, p. 417-26, 1999.

SAWYNOK, J. Adenosine receptor activation and nociception. **Eur J Pharmacol**, v. 347, n. 1, Apr 17, p. 1-11. 1998.

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

SCHIENE, K.; VRY, J. D.; TZSCHENTKE, T. M. Antinociceptive and antihyperalgesic effects of tapentadol in animal models of inflammatory pain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 339: 537-544, 2011.

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

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

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

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

SKALHEGG, B. S.; TASKÉN, K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway: differential expression, regulation and subcellular localization of subunits of PKA. **Frontiers in Bioscience. 2**: 331-342, 1997.

SONG, J. G.; HAHM, K. D. et al. Adenosine triphosphate-sensitive potassium channel blockers attenuate the antiallodynic effect of R-PIA in neuropathic rats. **Anesth Analg**, v. 112, n. 6, Jun, p. 1494-9. 2011.

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

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

STORY, G. M. et al. a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell** 112: 819-829, 2003.

STUCKY, C. L. et al. G.M. Roles of transient receptor potential channels in pain. **Brain Research Reviews** 60: 2-23, 2009.

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

TAFUR, J.; MILLS, P. J. Low-intensity light therapy: exploring the role of redox mechanisms. **Photomed Laser Surg**. 26(4): 323-8, 2008.

TAIWO, Y. O.; LEVINE, J. D. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. **Neuroscience** 44: 131-135, 1991.

TAYLOR, S. S. et al. Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1784: 16-26, 2008.

TEIXEIRA, M. J.; CORREA, C. F.; PIMENTA, C. A. M. **Dor: conceitos gerais**. São Paulo: Limay, p.72, 1994.

TEIXEIRA, M. J.; OKADA, M. Dor: Evolução histórica dos conhecimentos. In: NETO, O.A. et al. **Dor: Princípios e Práticas**. São Paulo: Ed. Artmed S.A., 2009.

TJOLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.

TRELLES, M. A.; ALLONES, I.; MAYO, E. Er: yag laser ablation of plantar verrucae with red led therapy-assisted healing. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 4, p. 494-498, 2006.

TRONGSAKUL, S. et al. The analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 221-225, 2003.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Research Reviews**, v. 46, p. 295-309, 2004.

VILLARREAL, C. F. et al. Acute and persistent nociceptive paw sensitization in mice: the involvement of distinct signaling pathways. **Life Sciences** 85: 822-829, 2009.

VINCK, E. et al. Evidence of changes in sural nerve conduction mediated by light emitting diode irradiation. **Lasers Med Sci**, v. 20, n. 1, p. 35-40, 2005.

VINCK, E. et al. Pain reduction by infrared light-emitting diode irradiation: A pilot study on experimentally induced delayed-onset muscle soreness in humans. **Lasers in Medical Science**, v. 21, n. 1, p. 11-18, 2006.

VIVANCOS, G. G.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H. Opposite nociceptive effects of the arginine/NO/cGMP pathway stimulation in dermal and subcutaneous tissues. **Br J Pharmacol**, v. 138, n. 7, p. 1351-7, Apr 2003.

WANG, H. et al. Conditioned fear stress combined with single-prolonged stress: A new PTSD mouse model. **Neuroscience Research**, v. 73, p. 142-152, 2012.

WANG, H.; WOOLF, C. J. Pain TRPs- Minireview. **Neuron**, v. 46, p. 9-12, 2005.

WANG, S. et al. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain** 131: 1241-1251, 2008.

WARD, U.; NILSSON, U. G. Acupuncture for postoperative pain in day surgery patients undergoing arthroscopic shoulder surgery. **Clin Nurs Res** 22(1):130-136. 2013.

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

WHEELER-ACETO, H.; COWAN, A. Neurogenic and tissue mediated components of formalin-induced oedema: evidence for supraspinal regulation. **Agents Actions**, v. 34, p. 264-269, 1991;

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

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

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

WONG-RILEY, M. T et al. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. **J Biol Chem**. 280(6): 4761-71, 2005.

WOOLF, C. J. Pain. **Neurobiological Disease**, v. 7(5), p. 504-510, 2000.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science** 288: 1765-1768, 2000.

WU, C. L.; RAJA, S. N. **Treatment of acute postoperative pain**. v. 377, Issue 9784, Pages 2215–2225, 25 June–1 July 2011.

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

YAJIMA, Y. Et al. Differential involvement of spinal protein kinase C and protein kinase A in neuropathic and inflammatory pain in mice. **Brain Research** 992: 288–293, 2003

YOON, M. H. et al. Antinociception of intrathecal adenosine receptor subtype agonists in rat formalin test. **Anesth Analg**, v. 101, n. 5, Nov, p. 1417-21. 2005.

YOSHIMURA, M.; FURUE, H. Mechanisms of the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. **Journal of Pharmacological Sciences** 101: 107-117, 2006.

YU, W.; NAIM, J. O.; MCGOWAN, M.; IPPOLITO, K.; LANZAFAME, R. J. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. **Photochem Photobiol**. 66: 866-871, 1997.

## **ANEXOS**

## Anexo A – Carta de aprovação CEUA-UFSC



Universidade Federal de Santa Catarina  
 Pró-Reitoria de Pesquisa – PRPe  
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

**Resultado de Solicitação de Protocolo****Protocolo**

PP00745

**Título**

Protocolos dos modelos comportamentais utilizados no laboratório de neurobiologia da dor e da inflamação

**Data de Entrada**

13/06/2012

**Resultado:**

Aprovado

**Data/Prazo**

05/12/2014

**Considerações**

Ofício nº 223/CEUA/PROPESQ/2014

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a), Adair Roberto Soares dos Santos, Departamento de Ciências Fisiológicas - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO adendo para utilização de dois mil e quarenta camundongos (*Mus musculus*)

Adita-se o Ofício nº 146/CEUA/PROPESQ/2014

Ofício nº 91/CEUA/PRPE/2012

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Adair Roberto Soares dos Santos, Departamento de Ciências Fisiológicas - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

Os procedimentos elencados no parecer estão credenciados para uso no seu laboratório pelo período de quatro anos. Qualquer alteração destes, ou inclusão de novos, deverão ser apreciados pela CEUA-UFSC novamente.

Este credenciamento é válido para a utilização das espécies animais: doze mil e novecentos e sessenta camundongos (*Mus musculus*) e um mil trezentos e quarenta e quatro ratos (*Rattus Norvegicus*).

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC

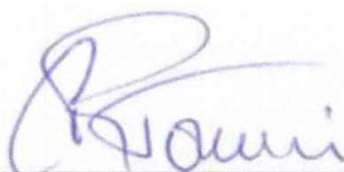
Por ocasião do término deste período de credenciamento, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estes procedimentos aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**  
**Data 09/01/2017**

Data 08/12/2014

**Parecer(es):**



**Prof. Assóc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC**  
**PRESIDENTE**