



**Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica
e Informática Industrial**

VANESSA ERTHAL

**MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA POR MEIO DA RADIAÇÃO
LASER NO ACUPONTO E36 (ZUSANLI) EM CAMUNDONGOS**

TESE DE DOUTORADO

**CURITIBA
FEVEREIRO/2016**

VANESSA ERTHAL

**MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA POR MEIO DA RADIAÇÃO LASER NO ACUPONTO E36
(ZUSANLI) EM CAMUNDONGOS**

Tese de Doutorado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Percy Nohama

Co-orientadora: Dr^a. Cristiane Hatsuko Baggio

**CURITIBA
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

E73m Erthal, Vanessa
2016 Mecanismos de ação envolvidos na atividade anti-inflamatória e antinociceptiva por meio da radiação LASER no acuponto E36 (Zusanli) em camundongos / Vanessa Erthal.-- 2016.
xx, 112 p.: il.; 30 cm

Texto em português, com resumo em inglês.
Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Curitiba, 2016.
Bibliografia: p. 97-110.

1. Acupuntura. 2. Nociceptores. 3. Agentes anti-inflamatórios. 4. Pontos de acupuntura. 5. Lasers em medicina. 6. Engenharia biomédica. 7. Engenharia elétrica - Teses. I. Nohama, Percy, orient. II. Baggio, Cristiane Hatsuko, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial. IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 621.3

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba

Título da Tese N°. 132

Mecanismos de ação envolvidos na atividade anti-inflamatória e antinociceptiva por meio da radiação LASER no acuponto E36 (Zusanli) em camundongos

por

Vanessa Erthal

Orientador: Prof. Dr. Percy Nohama (UTFPR)

Coorientador: Prof^a. Dr. Cristiane Hatsuko Baggio (UFPR)

Esta tese foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de DOUTOR EM CIÊNCIAS – Área de Concentração: Engenharia Biomédica, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial – CPGEI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, às 9h do dia 26 de fevereiro de 2016. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta pelos doutores:

Prof. Dr. Percy Nohama
(Presidente – UTFPR)

Prof^a. Dr. Maria Fernanda de Paula
Werner
(UFPR)

Prof. Dr. Cleiton José Tremil
(FAPAR)

Prof. Dr. Munir Antonio Gariba
(PUCPR)

Prof^a. Dr. Mauren Abreu de Souza
(UTFPR)

Visto da Coordenação:

Prof. Emilio Carlos Gomes Wille, Dr.
(Coordenador do CPGEI)

Quando a alma está feliz
a prosperidade cresce,
a saúde melhora, as
amizades aumentam, enfim,
o mundo fica de bem com você....
"O mundo exterior reflete o
universo interior"

Mahatma Gandhi

Dedico este trabalho a minha filha Bianca Erthal
de Abreu e aos meus pais Iraídes Francisca
Erthal e Rubens Erthal

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao professor Percy Nohama, por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho, pelos ensinamentos compartilhados e pela sua orientação e amizade.

A professora Cristiane Baggio pela paciência, orientação e ajuda no desenvolvimento deste trabalho e pela grande amizade.

A professora Maria Fernanda Werner por abrir as portas de seu laboratório e contribuir com todos os materiais para a realização dos experimentos.

A minha eterna gratidão aos meus pais e a minha filha que sempre me apoiaram em todos os momentos, principalmente em dificuldades emocionais e ausências.

Ao Valter Mendes Filho pelo carinho, paciência e ajuda por todos os problemas com o computador, programa e fotos.

Às amigas que de alguma forma me ajudaram nesse trabalho desde o início Morgana, Débora, Marina, Daniele e Fernanda e ao amigo Eddy.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia (UFPR) e do Departamento da Universidade Federal Tecnológica do Paraná (UFTPR).

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

A Deus, acima de tudo, por iluminar meus caminhos para a realização deste trabalho.

RESUMO

ERTHAL, Vanessa. **Mecanismos de ação envolvidos na atividade anti-inflamatória e antinociceptiva por meio da radiação LASER no acuponto E36 (Zusanli) em camundongos**. 112 f. (Tese de doutorado) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

Introdução: A acupuntura LASER (LA) é uma técnica da área de saúde que aplica LASER de baixa intensidade em pontos de acupuntura, sendo capaz de produzir uma ação biológica que resulta em efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos nas células. E36 (Zusanli) é um ponto da acupuntura comumente usado para tratamento de várias alterações patológicas, tais como inflamação, dor aguda e distúrbios gastrointestinais. **Objetivo:** Investigar os possíveis mecanismos de ação da LA no acuponto E36 (Zusanli) nas atividades anti-inflamatória e antinociceptiva em modelos agudos e crônicos em camundongos. **Método:** Os animais foram tratados com LA (830 nm, 4 J/cm² e 30 mW) no ponto de acupuntura E36. O experimento utilizado para avaliar a ação anti-inflamatória da LA foi o de inflamação aguda induzida pela carragenina no modelo do edema de pata, o qual foi avaliado por micrometria e termografia infravermelha. Depois disso, os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e glutatona reduzida (GSH) foram quantificados. Em outro conjunto de experimentos, o edema da pata foi induzido por bradicinina (BK), histamina (HIST) e prostaglandina E2 (PGE2). A nocicepção foi avaliada pela indução química (glutamato, capsaicina e cinamaldeído). Também foi avaliada a alodínia mecânica no modelo de dor neuropática pelo modelo de Ligadura Parcial do Nervo Ciático (LPNC) e de inflamação crônica induzida pelo Complexo Adjuvante Freund (CFA). Os sistemas muscarínicos, adrenérgicos α_1 e α_2 e adenosinérgicos foram avaliados após o tratamento com LA no acuponto E36, no pré-tratamento utilizando atropina, prazosina, ioimbina e cafeína, verificado no modelo do glutamato. **Resultados:** A LA no acuponto E36 inibiu significativamente a formação de edema durante 4 h e reduziu a temperatura da pata em 10%, após a injeção de carragenina. Além disso, a LA também reduziu os níveis de ROS (55%) e LOOH (50%); no entanto, não alterou os níveis de GSH. A aplicação do LA reduziu o edema da pata induzido por BK (30 min: 6%, 60 min: 7%), HIST (30 min: 11%) e de PGE2 (90 min: 10%, 120 min: 16%). No acuponto E36, a LA reduziu a nocicepção induzida pelo glutamato, capsaicina e cinamaldeído com inibição de 44%, 53% e 80%, respectivamente. Uma única aplicação inibiu a ação nociceptiva nos modelos do LPNC e CFA. Em longo prazo, o tratamento com LA, uma vez ao dia, também reduziu a alodínia mecânica durante oito dias de aplicação. Os sistemas muscarínicos, adrenérgicos α_2 e adenosinérgicos parecem estar ligados ao efeito da estimulação da LA no acuponto E36, pois a redução do comportamento nociceptivo foi revertido pelos antagonistas utilizados, quando verificado no modelo do glutamato. Porém, o efeito antinociceptivo da LA não foi influenciado pelo antagonista do receptor α_1 adrenérgico. **Conclusão:** Os resultados sugerem uma importante atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da LA no acuponto E36 em modelos experimentais de nocicepção e inflamação aguda e crônica em camundongos, por meio dos sistemas muscarínicos, adrenérgicos α_2 e adenosinérgicos.

Palavras-chave: Acupuntura Laser, nocicepção, inflamação, acuponto E36.

ABSTRACT

ERTHAL, Vanessa. **Mechanisms involved in anti-inflammatory and antinociceptive activity by radiation in LASER acupoint ST36 (Zusanli) in mice.** 112 p (doctoral) Graduate Program in Electrical and Computer Engineering of Federal University of Technology-Paraná. Curitiba, 2016.

Introduction: LASER acupuncture (LA) is a health care technique in which Low-intensity LASER is yielded in acupuncture points to produce a biological action in order to induce biochemical, bioenergetic and bioelectrical effects in cells. ST36 (Zusanli) is acupuncture point commonly used for treating various pathological changes, such as inflammation, acute pain and gastrointestinal disorders. **Objective:** To investigate the possible mechanisms of action of LA in ST36 (Zusanli) acupoint on the anti-inflammatory and antinociceptive activities in acute and chronic models in mice. **Method:** Animals were treated with LA (830 nm, 4 J/cm², 30 mW) in ST36 acupuncture point. The experiment used to assess the anti-inflammatory action of LA was the model of acute inflammation induced by carrageenan in the rat paw edema model, which was evaluated by micrometry and infrared thermography. After that, the levels of reactive oxygen species (ROS), lipid hydroperoxide (LOOH) and reduced glutathione (GSH) were quantified. In another set of experiments, paw edema was induced by bradykinin (BK), histamine (HIST) and prostaglandin E2 (PGE2). Nociception was evaluated by chemical induction (glutamate, capsaicin and cinnamaldehyde). It was also evaluated the mechanical allodynia in models of neuropathic pain, applying the Partial Sciatic Nerve Ligation model (PSNL) and chronic inflammation by means of Complete Freund's Adjuvant (CFA). Muscarinic, adrenergic α_1 and α_2 and adenosinergic systems were assessed after treatment of LA in ST36 acupoint with pre-treatment using atropine, prazosin, yombina and caffeine, found in glutamate model. **Results:** LA in acupoint ST36 significantly inhibited edema formation during 4 h after carrageenan injection in the paw and reduced the temperature by 10%. Moreover, LA also reduced the levels of ROS (55%) and LOOH (50%), however, did not alter levels of GSH. The application of LA reduced paw edema induced by BK (30 min: 6%, 60 min: 7%), HIST (30 min: 11%) and PGE2 (90 min: 10%, 120 min: 16%). LA in ST36 acupoint reduced the nociception induced by glutamate, capsaicin and cinnamaldehyde with inhibition of 44%, 53% and 80%, respectively. A single application inhibited the response of mechanical allodynia in models of PSNL and CFA. The long-term treatment with LA, once a day, also reduced mechanical allodynia for eight days of application. Muscarinic, adrenergic α_2 and adenosinergic systems appear to be linked to the effect of stimulation of the ST36 acupoint in LA, since reducing the nociceptive behavior was reversed by antagonists used when checked in glutamate model. However, the analgesic effect of LA was not influenced by antagonist α_1 adrenergic receptor. **Conclusion:** The results suggest an important antinociceptive and anti-inflammatory activity of LA in ST36 acupoint in experimental models of nociception and acute and chronic inflammation in mice by means of muscarinic systems, adrenergic α_2 and adenosinergic.

Keywords: Laser acupuncture; nociception; inflammation, ST36 acupoint.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação de um Nociceptor.....	28
Figura 2: Processamento fisiológico da dor.....	29
Figura 3: 3 principais tipos de dor.....	33
Figura 4: Profundidade de penetração do LASER.....	45
Figura 5: Mecanismos de ação da Terapia LASER.....	47
Figura 6: Localização do acuponto E36 em humanos.....	52
Figura 7: LASERPULSE, caneta LASER comprimento de onda 830 nm, fabricado pela IBRAMED.....	54
Figura 8: Localização do acuponto E36 em camundongos.....	55
Figura 9: Aplicação da LA no acuponto E36.....	55
Figura 10: Medidor de potência Pocket Power.....	56
Figura 11: Análise termográfica.....	60
Figura 12: Modelo de nocicepção pela injeção de glutamato.....	61
Figura 13: Localização da ligadura Parcial do Ciático.....	63
Figura 14: Avaliação da alodínia mecânica.....	64
Figura 15: Efeitos do LASER ON sobre o edema induzido pela carragenina na pata..	68
Figura 16: Efeito do LASER ON sobre o edema de pata induzido pela carragenina, após 2 horas de tratamento.....	68
Figura 17: Efeito da LA no edema de pata induzido pela carragenina através da análise das espécies reativas de oxigênio, lipoperóxidos e glutathione reduzida.....	69
Figura 18: Análise do efeito da LA no edema de pata induzido pela carragenina através da termografia.....	71
Figura 19: Efeito antinociceptivo do LASER ON no acuponto E36 modelo de nocicepção induzido pelo glutamato na pata.....	72
Figura 20: Efeito antinociceptivo do LASER ON no acuponto E36 no modelo de nocicepção induzido pela capsaicina na pata.....	73
Figura 21: Efeito antinociceptivo do LASER ON no acuponto E36 no modelo de nocicepção induzido pela cinamaldeído na pata.....	73
Figura 22: Efeito da LA no acuponto E36 sobre a alodínia mecânica no modelo de ligadura parcial do ciático.....	74

Figura 23: Efeito da LA no acuponto E36 sobre a alodínia mecânica no modelo induzido pelo CFA.....	75
Figura 24: Participação no sistema Colinérgico no efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36.....	76
Figura 25: Participação no sistema Adrenérgico α 1 no efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36.....	77
Figura 26: Participação no sistema Adrenérgico α 2 no efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36.....	78
Figura 27: Participação no sistema Adenosinérgico no efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36.....	78
Figura 28: Esquema dos efeitos anti-inflamatórios da LA no acuponto E36.....	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Parâmetros da terapia LASER de baixa potência.....	43
Quadro 2: Tipos de emissão, comprimentos de onda, pulso e indicações do LASER.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros aplicados na LA.....	56
Tabela 2: Efeito da LA no acuponto E36 no edema induzido por agentes flogísticos na pata do camundongo.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT:5-hidroxitriptamina

ACC: Córtex cingulado anterior

ADP: Adenosina Difosfato

AMPA: cainato α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato

ASICs: Canais iônicos sensíveis ao ácido

AsGa: Arseneto de gálio

AsGaAl: Arseneto de gálio e Alumínio

ATP: trifosfato de adenosina

B40: Acuponto Bexiga 40

B67: Acuponto Bexiga 67

BK: bradicinina

BP6: Acuponto Baço-Pancreas 6

C7: acuponto Coração 7

CAN: Cânfora

CEA: Amígdala

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CFA: Complexo Adjuvante de Freund's

CGRP: Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CIA: Artrite induzida por colágeno

COX ciclooxigenase

CPF: córtex pré-frontal

DEXA: Dexametasona

DFC: 2', 7'-diclorofluoresceína

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

E36: Acuponto Estômago 36

EA: Eletropuntura

E.P.M.: Erro padrão da média

F8: acuponto Fígado 8

F14: acuponto Fígado 14

GABA: Ácido gama-amino butírico

GRD: Ganglio da raiz dorsal
GSH: Glutathiona
HeNe: Hélio-neônio
HIST: Histamina
IC: Córtex insular
IG4: Acuponto Intestino Grosso 4
IL-6: Interleucina 6
IL-8: Interleucina 8
IL-1 β : Interleucina 1 β
i.p.: Intraperitoneal
i.pl.: Intraplantar
K⁺: Íon potássio
LA: Laser acupuntura
LASER Amplificação da luz através da emissão estimulada de radiação
LC: Locus coeruleus
LCR: líquido cefalo-raquidiano
LOOH: hidroxiperóxido lipídico
LPNC: Ligadura parcial do nervo ciático
mGluR: receptores glutamatérgicos metabotrópicos
Na⁺: Íon sódio
Nav: canais de sódio
NGF: neutrotrofina
NMDA: N-metil-D-aspartato
NO: Óxido nítrico
P2x: Receptores purinérgicos x
P2y: Receptores purinérgicos y
PAG: Substância Cinzenta Periaquedutal
PBRP: Ponto de Baixa Resistência Elétrica da Pele
PC6: Acuponto pericárdio 6
PG: prostaglandina
pH: Potencial hidrogeniônico
PKC: fosfolipase C

PMA: Miristato-acetato de forbol
R3: acuponto Rim 3
ROS: Espécies Reativas de oxigênio
RR: Vermelho de Rutênio
RVM: Medula ventromedial
S1: córtex somatossensorial
s.c.: sub-cutâneo
SNA: Sistema nervoso autônomo
SNC: Sistema Nervoso Central
SNP: Sistema Nervoso Periférico
SP: Substância P
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral α
TRP: Receptor de potencial transitório
TRPA: Receptor de potencial transitório anquirina
TRPM: Receptor de potencial transitório melastatina
TRPV: Receptor de potencial transitório vanilóide
TXs: tromboxanas
VB30: Acuponto vesícula biliar 30
VB37: Acuponto vesícula biliar 37
VC12: Acuponto Vaso da Conceção 12
VC14: acuponto Vaso da Conceção 14
VIP: peptídio intestinal vasoativo
VG1: Acuponto Vaso Governador 1
VG20: Acuponto Vaso Governador 20

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	21
1.1. DEFINIÇÃO DO PROBLEMA.....	21
1.2. OBJETIVOS.....	24
1.3. ORGANIZAÇÃO DO DOCUMENTO... ..	25
CAPÍTULO 2: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	26
2.1 DOR.....	26
2.2 INFLAMAÇÃO.....	37
2.3 LASER.....	40
2.3.1 Princípios físicos.....	42
2.3.2 Efeitos Fisiológicos.....	45
2.4 Estômago 36 (E36).....	51
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1. ANIMAIS.....	53
3.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
3.3 PROCEDIMENTO DO TRATAMENTO LA.....	54
3.4 CALIBRAÇÃO DO APARELHO.....	56
3.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE NOCICEPÇÃO AGUDO E CRÔNICO E INFLAMAÇÃO AGUDA.....	57
3.5.1. Avaliação Antiinflamatória.....	57
3.5.1.1 Edema de pata induzida por carragenina.....	57
3.5.1.1.1.Determinação dos níveis de LOOH, GSH e ROS após o edema de pata induzido pela carragenina.....	57
3.5.1.1.1.1 Preparação de frações subcelulares.....	57
3.5.1.1.1.2 Determinação de proteínas no extravazamento plasmático.....	57
3.5.1.1.1.3 Determinação dos radicais livres intracelular.....	58

3.5.1.1.1.4 Determinação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH).....	58
3.5.1.1.1.5 Determinação dos níveis de glutathione (GSH).....	59
3.5.1.1.2 Análise termográfica.....	60
3.5.1.1.3 Edema de pata induzida por diferentes mediadores químicos.....	60
3.5.2 Avaliação antinociceptiva.....	60
3.5.2.1 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato.....	60
3.5.2.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina.....	61
3.5.2.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído.....	62
3.5.2.4 Modelo de neuropatia induzida pela ligadura parcial do nervo ciático.....	62
3.5.2.5 Modelo de dor inflamatória crônica induzida pelo Complexo Adjuvante de Freund's.....	64
3.6 ANÁLISE DOS SISTEMAS.....	64
3.6.1 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36.....	64
3.6.1.1 Participação no sistema colinérgico.....	65
3.6.1.2 Participação no sistema adrenérgico.....	65
3.6.1.3 Participação no sistema adenosinérgico.....	65
CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....	67
4.1 PRIMEIRA ETAPA: EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO.....	67
4.1.1 Efeito da LA no acuponto E36 no edema de pata induzido pela carragenina.....	67
4.1.1.1 Efeito da LA no acuponto E36 no edema induzido pela carragenina na pata, após duas horas de tratamento.....	67
4.1.1.2 Efeito da LA no acuponto E36 sobre as espécies reativas de oxigênio, lipoperóxidos e glutathione reduzida induzidas pela injeção de carragenina na pata de camundongo.....	69
4.1.1.3 Análise do efeito da LA no acuponto E36 no edema induzido pela carragenina por meio da termografia.....	70
4.1.1.4 Efeito da LA no acuponto E36 no edema de pata induzido por diferentes mediadores inflamatórios.....	70
4.2 SEGUNDA ETAPA: EFEITO ANTINOCICEPTIVO.....	71

4.2.1 Efeito da LA no acuponto E36 no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato.....	71
4.2.2 Efeito da LA no acuponto E36 no modelo de nocicepção induzida pela capsaicina.....	72
4.2.3 Efeito da LA no acuponto E36 no modelo de nocicepção induzida pelo cinamaldeído.....	72
4.2.4 Efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36 no modelo de ligadura parcial do ciático.....	74
4.2.5 Efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36 no modelo CFA.....	75
4.3 TERCEIRA ETAPA: ANÁLISE DOS SISTEMAS.....	75
4.3.1 Participação no sistema colinérgico no efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36.....	75
4.3.2 Participação nos receptores adrenérgicos α_1 no efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36.....	76
4.3.3 Participação nos receptores adrenérgicos α_2 no efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36.....	77
4.3.4 Participação no sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36.....	77
 CAPITULO 5: DISCUSSÃO.....	 79
 CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES.....	 93
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 96
 ANEXO.....	 110
ANEXO A- AUTORIZAÇÃO DO CEUA-UFPR.....	110
 ARTIGOS PUBLICADOS.....	 112

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO DO PROBLEMA

A dor é uma experiência multidimensional sensorial, que pode variar em intensidade, qualidade, duração, localização (superficial ou profunda) e é desencadeada por estímulos nocivos, inflamatórios ou danos no tecido nervoso (WOOLF, 2004; YAKSH, 2005). Ela exerce uma função importante, pois seu papel fisiológico é alertar sobre possíveis ameaças ao bem estar e à integridade do organismo, além de reter a atenção até que sua causa tenha sido identificada e tratada (CHAPMAN e GAVRIN, 1999; WALL, 1999). Desta forma, a dor é um sinal vital clinicamente necessário para a detecção e avaliação de inúmeras doenças, bem como para induzir ao comportamento de precaução e, conseqüentemente, à limitação de danos (LOESER e MELZACK, 1999; MILLAN, 1999; WOOLF, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2004). Porém, a dor é desagradável e pode gerar um intenso sofrimento. Afeta milhões de pessoas e é responsável por uma grande procura nos consultórios médicos, levando a alterações na capacidade funcional e mental, na interação social e na qualidade de vida (VOSCOPOULOS e LEMA, 2010; RODGER *et al.*, 2015). No Brasil, a dor está presente em 70% dos casos de consultas médicas, iniciada por motivos variados (ROCHA, 2007). E segundo a Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor, a dor crônica atinge cerca de 30% da população brasileira (DOR, 2014). Por esse motivo, bilhões de reais são gastos anualmente em tratamentos médicos representando um alto custo para o país (DOR, 2014). Além disso, é uma das causas mais comuns de ausência no trabalho e aposentadoria precoce. A dor prejudica o ambiente familiar diminuindo a qualidade de vida, aumentando a depressão, o estresse e os custos financeiros (RENN e DORSEY, 2005). Desta forma, estudos de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da dor e da inflamação aguda ou crônica são muito relevantes. Porém, tratamentos farmacológicos com drogas analgésicas e anti-inflamatórias têm efeitos colaterais indesejáveis, que podem levar desconforto e riscos aos pacientes. Nesse sentido, desperta-se um maior interesse

no desenvolvimento de métodos complementares livres de efeitos adversos, como os que utilizam métodos físicos (BERTOLINI *et al.*, 2011; LOPEZ-RAMIREZ *et al.*, 2012; MORE *et al.*, 2013; FABRE *et al.*, 2015).

Existem técnicas não medicamentosas que produzem importante efeito analgésico e anti-inflamatório, dentre as quais, destaca-se a acupuntura. Esta técnica consiste na inserção de agulhas em determinadas regiões para produzir seus efeitos terapêuticos (MEDEIROS *et al.*, 2003). Porém, existem outras formas para se estimular os pontos de acupuntura, também denominados acupontos, além das agulhas, como por exemplo, por meio da estimulação elétrica, da dígito-pressão e da radiação LASER de baixa potência (SCOGNAMILLO-SZABÓ, 2001).

A radiação LASER ou fotobioestimulação não invasiva é uma técnica alternativa associada à acupuntura, a qual vem sendo utilizada nos últimos 25 anos. Consiste em um tratamento rápido, com baixo risco de infecção e é considerada ideal para pacientes com fobia de agulhas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). O LASER de baixa potência aplicado no acuponto produz energia luminosa capaz de induzir uma ação que provocará efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos nas células e tecidos (CABRERA, 2002; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Recentemente, estudos científicos da ação fotobiomoduladora do LASER em processos álgicos e inflamatórios são objetos ávidos de estudos e continuam sendo um desafio para a Ciência. Seus mecanismos de ação ainda não estão completamente esclarecidos, principalmente na técnica da acupuntura (MAIA *et al.*, 2012; KINGSLEY *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015; FABRE *et al.*, 2015). Autores como Cabrera, Péron e Alfonso (2002) publicaram resultados demonstrando o efeito do LA; porém, não esclareceram totalmente sua ação. Além disso, faltam publicações de qualidade sobre o assunto e há dificuldades em se obter informações sobre os parâmetros técnicos do LASER utilizado na acupuntura, na literatura científica. Portanto, um número maior de estudos na técnica de acupuntura LASER (LA) faz-se necessário para elucidar os mecanismos de ação na dor e na inflamação, assim como os parâmetros técnicos utilizados na sua aplicação, entre os quais o comprimento de onda, o tempo de aplicação e a energia irradiada no tecido, para que seja possível reproduzir clinicamente os achados encontrados em ensaios experimentais.

Estudos clínicos randomizados, duplo-cego e placebo controlado, utilizando o LASER, têm encontrado resultados nem sempre positivos. Segundo estudiosos, esse fracasso é atribuído a alguns fatores, principalmente a falta de descrição dosimétrica (HUANG *et al.*, 2009). Por isso, pesquisadores e terapeutas têm questionado os efeitos clínicos do LASER nos acupontos, devido aos resultados divergentes encontrados, face à carência de padronização metodológica nos estudos (ERTHAL *et al.*, 2013; FABRE *et al.*, 2015). Enquanto pesquisadores como Whittaker (2004) defendem seu efeito terapêutico, outros como Katsoulis e colaboradores (2010) contestam esta propriedade com dúvidas se o mesmo possui ação fisiológica ou se apresenta efeito placebo. Segundo Whittaker (2004), para obtenção de resultados significativos e científicos da eficácia da LA, faz-se necessário estabelecer uma avaliação sistemática dos seus parâmetros e realizar estudos em modelos experimentais para investigar os mecanismos de ação desta técnica.

Neste sentido, resultados prévios obtidos pela autora demonstraram que a radiação LASER de baixa potência no acuponto E36 (Zusanli) apresenta efeito antinociceptivo no modelo de nocicepção do ácido acético e na nocicepção induzida pela formalina em ratos (ERTHAL *et al.*, 2013). Além disso, demonstrou-se que os sistemas opioidérgico e serotoninérgico parecem estar envolvidos em seu mecanismo de ação. Outros autores, como Siedentopf e colaboradores (2005), também demonstraram o efeito da acupuntura LASER que, em seus estudos avaliados por meio da ressonância magnética funcional, concluíram que a técnica não é unicamente baseada em respostas medulares, mas também pela ativação de determinadas estruturas nas regiões do cérebro humano (SIEDENTOPF *et al.*, 2005). Esses dados destacam a importância da acupuntura LASER na prática clínica, tornando esse procedimento uma interessante técnica não medicamentosa para o tratamento de dor e inflamação; porém, novos estudos precisam ser realizados para um melhor conhecimento de seus efeitos e mecanismos, o que raramente é encontrado na literatura científica.

Segundo Jang e Lee (2012), a terapia LASER tem sido amplamente usada para o alívio da dor, mas relata que a eficácia da técnica ainda é controversa, principalmente devido ao número significativo de estudos experimentais ineficazes; e que pesquisadores sugerem que o seu mecanismo de ação na dor é baseado apenas

no efeito anti-inflamatório, pela inibição da formação de prostaglandina E2 (PGE2) (JANG e LEE, 2012).

Neste cenário, a realização do presente estudo é relevante em virtude da necessidade de pesquisa de novas técnicas terapêuticas tanto para o controle de dor quanto da inflamação (BAXTER *et al.*, 2008; KATSOULIS *et al.*, 2010), assim como avaliar o mecanismo de ação da LA no acuponto E36; da necessidade de extensão e confirmação dos resultados obtidos anteriormente em outros modelos animais de dor e inflamação (ENWEMEKA, 2009; LORENZINI *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2011). E, posteriormente, a possibilidade de estudos futuros utilizando a técnica do LASER na acupuntura a ser aplicada em humanos conduzirá a resultados mais eficientes e eficazes. Portanto, este estudo possibilita uma maior consolidação científica, de forma inédita, resolvendo os problemas da técnica pela padronização da metodologia, identificando a ação da LA nos tecidos e trazendo informações relevantes, como a resposta à pergunta se realmente a técnica atua no tratamento da dor e da inflamação.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desta pesquisa é avaliar os efeitos da radiação LASER no acuponto E36 nas atividades anti-inflamatória e antinociceptiva, em modelos de nocicepção e inflamação aguda e crônica, em camundongos.

1.2.2 Objetivos específicos

Para tanto, estabeleceu-se os seguintes objetivos específicos:

(1) avaliar o efeito da radiação LASER no acuponto E36 (Zusanli) na possível atividade anti-inflamatória sobre o modelo de edema de pata induzida pela carragenina e mediadores químicos em camundongos;

(2) verificar o efeito antinociceptivo da radiação LASER no acuponto E36 (Zusanli) em modelos de nocicepção química (glutamato, capsaicina e cinamaldeído);

(3) avaliar o possível efeito da radiação LASER no acuponto E36 sobre a dor crônica no modelo de neuropatia induzida pela ligadura parcial do nervo ciático e no modelo de inflamação crônica por meio da administração intraplantar (i.pl) de CFA em camundongos;

(4) verificar a possível participação dos sistemas colinérgico, adrenérgico e adenosinérgico na antinocicepção evocados pela radiação LASER no acuponto E36 (Zusanli), em camundongos no modelo de nocicepção química induzido pelo glutamato.

1.3 ORGANIZAÇÃO DO DOCUMENTO

Em razão das considerações apresentadas, o trabalho foi dividido em seis capítulos. No primeiro, apresenta-se a problemática da dor e a LA, a carência de estudos sobre a fotoestimulação na técnica da acupuntura e os objetivos a serem atingidos. O segundo capítulo trata da fundamentação teórica, com o intuito de fornecer subsídios teóricos necessários e no qual apresentam-se considerações sobre a dor, a inflamação, a LASER acupuntura, E36 (Zusanli) e seus efeitos. Descreve-se no terceiro capítulo, os materiais e os métodos empregados nesta pesquisa, assim como ressaltam-se os modelos experimentais. No quarto capítulo, apresentam-se os resultados da aplicação dos protocolos experimentais, os quais são expostos por meio de gráficos e dados estatísticos. No quinto capítulo, discutem-se os métodos empregados e os resultados obtidos à luz da literatura. E no capítulo 6, apresentam-se as conclusões e considerações finais da pesquisa.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo, são apresentados aspectos introdutórios relevantes para a compreensão dos assuntos a apresentação da tese. Estão divididos em quatro partes. Primeiramente aborda-se sobre dor, tais como conceitos, neurofisiologia e tipos. Em seguida, sobre inflamação, LASER e o acuponto E36. Buscou-se descrever os conteúdos necessários para o entendimento de leitores tanto da área da saúde quanto de ciências exatas.

2.1 DOR

A dor desempenha inúmeras funções importantes, pois seu papel fisiológico é alertar sobre possíveis lesões ou doenças que ameaçam o bem estar e a integridade do organismo, além de direcionar a atenção para identificar e tratar suas causas (CHAPMAN e GAVRIN, 1999; WALL, 1999; WOOLF, 2004). Desta forma, a dor é um sinal vital clinicamente importante para a avaliação de inúmeras doenças, bem como para induzir um comportamento de precaução e, conseqüentemente, limitação de danos (LOESER e MELZACK, 1999; MILLAN, 1999; WOOLF, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2004). Sem dúvida, sua principal e fundamental função é preservar a sobrevivência dos humanos (MELZACK, 2001). Porém, a dor é uma experiência subjetiva e pessoal, tem aspectos afetivos, sensoriais e comportamentais (DA SILVA, 2011). Esses aspectos influenciam a percepção da dor no ser humano e, por isso, um estímulo nocivo de mesma intensidade pode provocar reações e sensações diferentes em cada indivíduo (LOESER e TREEDE, 2008). Embora, seja uma sensação subjetiva, é possível identificar um componente fisiológico, chamado de nocicepção e outro componente emocional (WOOLF, 2004). Ambos os componentes permitem aos seres humanos o entendimento da dor. A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês *International Association for the Study of Pain*) define dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano real ou potencial ao tecido ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER e TREEDE, 2008). Segundo Woolf (2004), a dor pode ser dividida em adaptativa e mal adaptada: a primeira contribui para a proteção do organismo e a segunda é a sensação sensorial patológica do Sistema Nervoso

Central (SNC), a dor como uma doença (WOOLF, 2004). As sensações nociceptivas possuem vias neuroanatômicas, com receptores específicos que permitem a detecção e medida de um estímulo. A nocicepção pode ser definida como uma resposta fisiológica ou sensorial a uma lesão tecidual que, por sua vez, causa a sensação dolorosa (MILLAN, 1999). Ou, mais atualmente utilizado, a nocicepção é um termo fisiológico usado para descrever os processos neurais de decodificação e processamento do estímulo nocivo (LOESER e TREEDE, 2008). A qualidade da dor e o início das respostas protetoras são determinados por variados fatores estimulados pela medula espinal e por estruturas cerebrais superiores envolvidas na integração e modificação dos sinais nociceptivos (RUSSO e BROSE, 1998). A nocicepção envolve diferentes etapas, entre elas, a transdução, que consiste na conversão dos estímulos sensoriais em impulsos nervosos para serem enviados à medula e ao encéfalo, realizada pelos receptores periféricos. São cinco tipos de receptores sensoriais periféricos: o mecanoreceptor, que detecta a pressão ou o estiramento (ex: corpúsculo de Pacini); o termoreceptor, que detecta mudanças na temperatura (ex: receptores de calor); o fotoceptor; que detecta alterações da luz na retina do olho (ex: bastonetes); o quimioceptor, que detecta mudanças no paladar e olfato (ex: receptores dos corpúsculos gustativos) e o nociceptor, que é responsável por detectar o estímulo nocivo nas lesões teciduais (ex: terminações nervosas livres) (TORTORA, 2003).

O nociceptor, um tipo de neurônio sensorial primário, está alojado em estruturas anatômicas localizadas fora do SNC, seu corpo celular se encontra no gânglio trigeminal e da raiz dorsal (GRD) (PIOMELLI e SASSO, 2014). Está presente na pele, nos músculos, nas articulações e nas vísceras; são terminações nervosas livres, ativadas por qualquer estímulo de dano ou ameaça de lesão tecidual, capazes de transduzir e decodificar o estímulo nocivo em potencial de ação (LOESER e TREEDE, 2008; VOSCOPOULOS e LEMA, 2010; SEXTON *et al.*, 2014). Woolf (2004) afirma que a nocicepção compreende processos de transdução, condução, transmissão e percepção. A transdução, já descrita anteriormente, corresponde a conversão dos estímulos nocivos periféricos para uma atividade elétrica por meio dos nociceptores, conforme ilustrado na figura 1. Já a condução é a passagem do potencial de ação da periferia para o SNC; a transmissão é a transferência do impulso nervoso de um

neurônio para outro; e a percepção é a sensação do estímulo (WOOLF, 2004; FEIN, 2011).

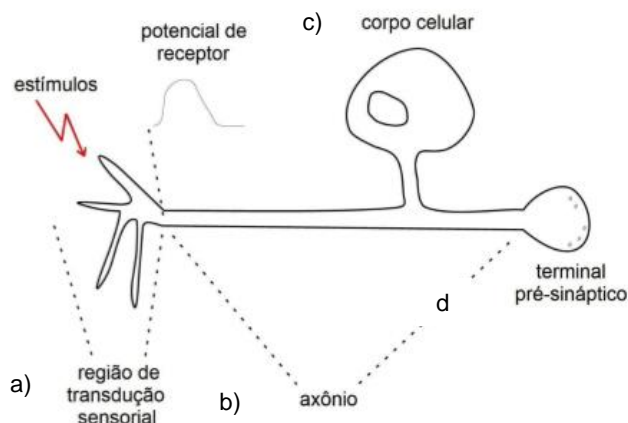


Figura 1. Representação de um nociceptor (terminações nervosas livres): (a) sensor, onde ocorre a transdução sensorial; (b) axônio; (c) corpo celular neuronal e (d) terminal sináptico. Ilustra-se também um potencial de receptor. Adaptada de FEIN (2011).

Os neurônios nociceptivos são sensibilizados por mudanças de temperatura como calor nocivo (estímulo nocivo térmico), distensão do tecido (estímulo nocivo mecânico) e a liberação local de mediadores químicos irritantes tais como bradicinina, serotonina, histamina, metabólitos do ácido araquidônico, ATP, adenosina, citocinas, aminoácidos excitatórios, substância P (SP), óxido nítrico (NO), opióides e acetilcolina, entre outros (JULIUS e BASBAUM, 2001; GRIFFIS *et al.*, 2006). É importante ressaltar que esses mediadores podem ser liberados não somente pelos neurônios sensoriais, mas também por fibras simpáticas e por células não neuronais como as plaquetas, as células endoteliais, os fibroblastos, as células de Schwann e as células inflamatórias (BESSON, 1997). Os nociceptores pertencem a quatro classes: térmicos, mecânicos, polimodais e silenciosos. Os térmicos respondem a temperaturas nocivas para o organismo (exemplo: as temperaturas consideradas quentes são $>43\text{ }^{\circ}\text{C}$), os mecânicos respondem a pressão intensa e os nociceptores polimodais respondem a todos os estímulos nocivos (estímulos térmicos, químicos e mecânicos) (FEIN, 2011). Existem, ainda, os nociceptores silenciosos (“*silent*” ou “*sleeping*”), que compreendem uma pequena proporção das fibras aferentes, os quais normalmente não são responsivos a estímulos. Entretanto, quando influenciados por mediadores inflamatórios, ou após a administração de agentes flogísticos, apresentam atividade espontânea ou

tornam-se sensibilizados e respondem aos estímulos sensoriais (JULIUS e BASBAUM, 2001). A estimulação dos nociceptores periféricos faz com que a informação nociceptiva seja levada por meio das fibras aferentes até o SNC, representado esquematicamente na figura 2. Os longos axônios das fibras nociceptivas, que se localizam em nervos periféricos e centrais, estendem-se de seus corpos celulares, reunidos no gânglio da raiz dorsal e no encéfalo. Após emergir de seu corpo celular, o axônio aferente primário bifurca-se para enviar prolongamentos concomitantemente à medula espinal e aos tecidos corporais (MILLAN, 1999).

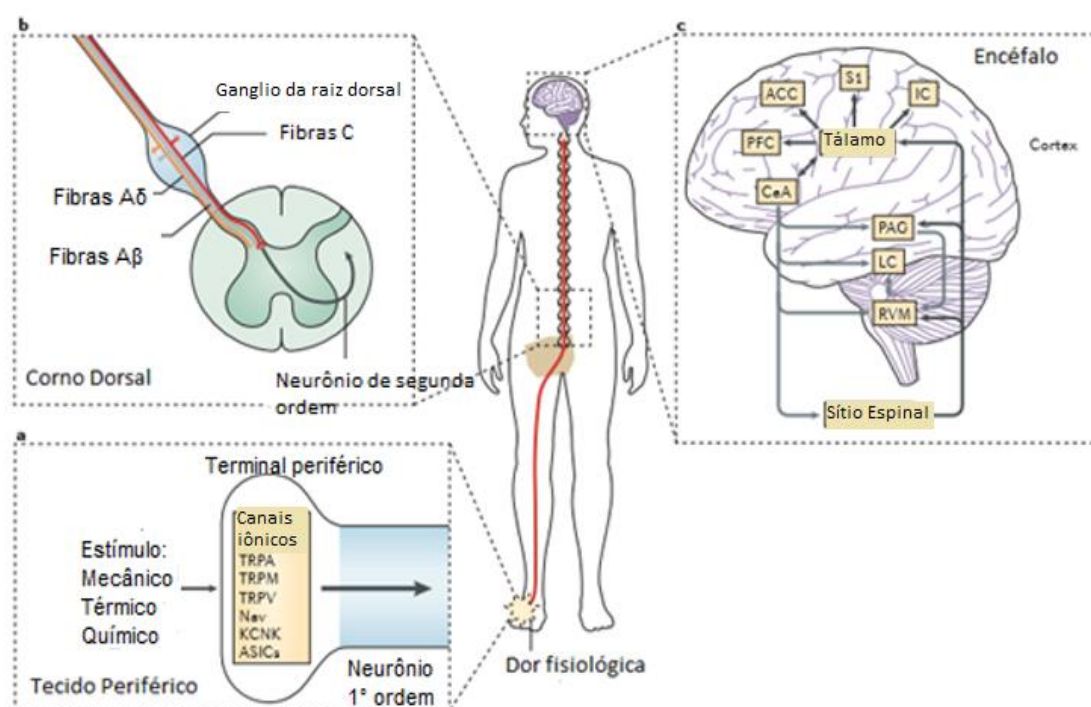


Figura 2: Processamento fisiológico da dor. Em: (a), Estímulos nociceptivos térmicos, mecânicos e químicos são transmitidos a partir do tecido periférico para os neurônios sensoriais nociceptivos (neurônios aferentes primários de primeira ordem) através dos terminais periféricos que são agrupados com os canais iônicos: TRPA1, TRPM8 e TRPV1, isoformas de canal de sódio (Nav), subtipos de canais de potássio (KCNK) e ASIC (H⁺). (b) Os potenciais de ação são conduzidos ao longo dos axônios nociceptivos fibras A δ e C, para o corno dorsal da medula. Os terminais centrais de fibras A δ e C fazem sinapse com interneurônios e neurônios de segunda ordem. Os axônios dos neurônios de segunda ordem seguem pelas fibras ascendentes do sistema ântero-lateral (feixe espino-talâmico lateral), para o tronco cerebral e núcleos talâmicos, a transferência de informações sobre a intensidade e duração dos estímulos nocivos periféricos. (c) Neurônios de terceira ordem do tálamo direcionam para várias regiões corticais e subcorticais que codificam sensorio-discriminativo o córtex somatossensorial (S1), emocional o córtex cingulado anterior (ACC), a amígdala (CEA) e córtex insular (IC), e cognitivo no córtex pré-frontal (CPF) aspectos da dor. No tronco cerebral também acontece a contribuição para a modulação descendente da dor, incluindo a substância cinzenta periaquedutal (PAG), locus coeruleus (LC) e medula ventro medial rostral (RVM). Modificado de Grace *et al.* (2014).

O nociceptor é ativado por várias substâncias endógenas que iniciam um potencial de ação, conduzidos por fibras nervosas em direção ao corno posterior da medula. Neste sentido, as fibras aferentes primárias são classificadas de acordo com critérios funcionais e anatômicos, dentre eles, velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização. Os neurônios mielinizados, de maior diâmetro e que apresentam maior velocidade de condução, são as fibras A β . Essas fibras respondem ao leve toque ou movimento e são importantes para informar a posição do corpo no espaço (propriocepção), são encontradas basicamente nos nervos que inervam a pele e em condições fisiológicas não contribuem para a sensação dolorosa (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Entretanto, a estimulação desse tipo de fibra pode aliviar a sensação dolorosa como ocorre quando ativadas por fricção da pele após alguma lesão. No entanto, ainda existem dois outros tipos de aferentes primários responsáveis pela transmissão da nocicepção da periferia à medula espinal. As fibras de pequeno e médio diâmetro originam a maioria dos nociceptores e incluem fibras C não mielinizadas e fibras pouco mielinizadas A δ , respectivamente. Estas fibras são responsáveis por transmitir o estímulo nociceptivo (PLEUVRY e LAURETTI, 1996; MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001). As fibras nociceptivas do tipo C são classificadas em dois grupos: (1) das fibras peptidérgica, que liberam os neurotransmissores peptídicos, a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e (2) das fibras C não peptidérgicas, expressam o receptor P2X3, um subtipo de canal iônico sensível ao ATP (JULIUS e BASBAUM, 2001; BASBAUM *et al.*, 2009).

Os neurônios sensoriais têm propriedades de transmissão através da fosforização dos canais iônicos presentes na membrana plasmática, os quais são ativados por estímulos externos, e causam alteração no fluxo de íons para o interior da membrana. Uma vez ativados, os canais iônicos, íons de sódio e cálcio fluem para o terminal periférico nociceptor, gerando uma corrente elétrica interior que despolariza a membrana (WOOLF, 2004). Se a despolarização é suficiente para ativar os *voltage-gated ion channel*, canais de sódio dependentes da tensão elétrica*, eles também vão abrir, despolarizando ainda mais a

*A palavra tensão será utilizada neste documento, ao invés de voltagem, tendo em vista a área do curso e em função do termo oficial utilizado pelo sistema internacional de unidade.

membrana e iniciando uma sequência de potenciais de ação, que serão responsáveis pela frequência e a duração do estímulo nocivo (WOOLF, 2004). A continuação da condução desses potenciais ocorre pela expressão de vários *voltage-gated sodium channels* nos neurônios sensoriais, principalmente os NAV1.8 e NAV1.9, exclusivos dos nociceptores.

Outros receptores responsáveis pela transdução do sinal no nociceptor são os receptores de potencial transitório (TRP), que participam de sensações dolorosas evocadas por estímulos nocivos (exemplo: capsaicina). Esses TRP possuem subfamílias que são os TRP termicamente sensíveis. Os mais importantes são: o receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1), o receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) e o receptor de potencial transitório melastatina 8 (TRPM8). Os TRPV1 são ativados por temperaturas maiores que 43°C e estímulos químicos (exemplo: a capsaicina), cuja ativação provoca a sensação de queimação. O TRPA1 detecta estímulos químicos irritantes (exemplo: o cinamaldeído encontrado na canela) e temperaturas abaixo de 17°C, evocam a sensação de picadas (MCNAUGHTON, 2010). E, finalmente, o TRPM8, que também é ativado por agentes químicos, como o mentol e por temperaturas frias moderadas (MCNAUGHTON, 2010). Outra família importante na transdução dos estímulos nocivos é a dos receptores dos canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs) ativados por prótons, os quais são sensibilizados por acidose local. Ou seja, desempenham uma função fundamental na percepção da diminuição do pH no tecido. Os receptores ASICs estão localizados em todo sistema periférico ou SNC e são expressos no processo de inflamação, câncer e isquemia (MCNAUGHTON, 2010; KWEON e SUH, 2013).

Portanto, do ponto de vista neurofisiológico, para a percepção da dor, necessita-se da participação do SNC e do SNP. Os neurotransmissores mais importantes, liberados ao nível medular, são: substância P, aspartato, glutamato, serotonina, noradrenalina, acetilcolina, colecistocinina e ácido gama-aminobutírico (GABA). A excitabilidade aumentada ocorre em função de despolarizações repetitivas das fibras não mielinizadas do tipo C, que resulta em uma prolongada descarga no corno dorsal da medula espinhal. Esse fenômeno é conhecido como “*wind up*” (DAVIES e LODGE, 1987; HERRERO *et al.*, 2000) e significa um aumento progressivo no número de potenciais de ação por um estímulo que ocorre em neurônios do corno dorsal. Esses episódios repetitivos

de “*wind up*” podem levar à potencialização a longo prazo (LTP- *long term potentiation*), a qual envolve um aumento prolongado na transmissão sináptica (POCKETT, 1995). Esses fenômenos induzirão inúmeras alterações em receptores (principalmente, os de glutamato e taquicinas) e segundo mensageiros intracelulares (destacando-se a PKC) (OTSUKA e YOSHIOKA, 1993; HERRERO *et al.*, 2000).

Os neurônios do corno dorsal, por sua vez, projetam seus axônios e transmitem a informação nociceptiva para os centros encefálicos superiores, que, através de neurônios terciários enviam informação ao córtex cerebral, onde ocorre o processamento que resulta em consciência da dor (FURST, 1999; MILLAN, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2004). Os principais tratos que carregam a informação nociceptiva da medula para o encéfalo são o espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico e espinohipotalâmico (CRAIG *et al.*, 1999). Segundo Romera *et al.* (2000), na transmissão encefálica, existem muitas substâncias relacionadas à transmissão da dor, como: substância P, colecistoquinina, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), bradicinina, neurotensina, catecolaminas e glutamato (ROMERA, 2000).

Quanto à sua origem, a dor pode ser classificada em: nociceptiva, neurogênica, neuropática, psicogênica e inflamatória (figura 3). A dor nociceptiva decorre da sensibilização do receptor nociceptivo localizados nas vísceras, pele e outros tecidos por um estímulo periférico. A dor neurogênica reflete dano de tecido neuronal na periferia ou no SNC. Quando há disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos, resultando em quadro álgico, chamava-se dor neuropática, esta poderia ou não ser distribuída para o dermatomo do nervo afetado e persistir por dias, meses ou anos (ZIMMERMANN, 2001; SCHOLZ e WOOLF, 2007). Atualmente, a IASP define a dor neuropática em dor originada como consequência direta de uma lesão ou doença afetando o sistema somatossensorial. Esse tipo de dor gera uma sensação álgica atípica, onde o estímulo que normalmente não seria doloroso passa a ser, caracterizado como alodínia mecânica, também pode ocorrer a hiperalgesia mecânica e térmica, a qual a sensação do estímulo doloroso é aumentada (SCHOLZ e WOOLF, 2007).

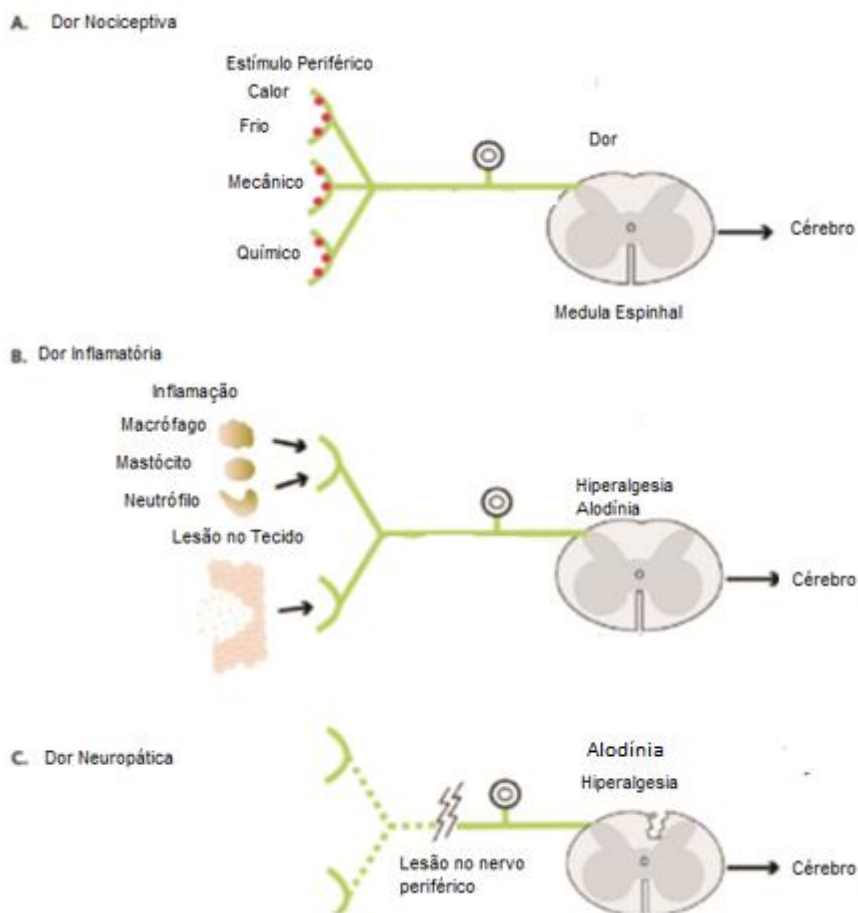


Figura 3: Os três principais tipos de dor: (A) nociceptiva: ocorre pela sensibilização do nociceptor por meio de estímulos periféricos (calor, frio, mecânico e químico); (B) inflamatória: inicia após uma lesão no tecido; (C) neuropática: ocorre quando há dano no tecido nervoso (adaptado de Woolf, 2004).

No entanto, quando a dor não é proveniente de fonte somática identificável e pode refletir fatores psicológicos, define-se como dor psicogênica (MILLAN, 1999). E na dor inflamatória, ocorrem significativos danos teciduais, com dor geralmente mais persistente e acompanhada de inflamação. Nessas circunstâncias, ocorre um quadro de aumento da sensibilidade gerado pela estimulação e sensibilização dos nociceptores na periferia pelos mediadores químicos, produzidos pelo dano tecidual e pela inflamação (SERDIUK e GMIRO, 2012). Atualmente, também deve-se ressaltar a ativação das células gliais neuroinflamatórias como as microglias e os astrócitos, localizadas no cérebro e na medula espinhal, que são responsáveis por desempenhar um papel importante na transmissão da nocicepção (VALLEJO *et al.*, 2010).

A sensação dolorosa possui duas categorias a aguda e a crônica. Na dor aguda, geralmente ocorre lesão tecidual e ativação de nociceptores no local. Clinicamente, a dor aguda é um sintoma que tende a ser limitado; geralmente responde a um tratamento simples e possui um excelente prognóstico (RENN e DORSEY, 2005).

A mudança de dor aguda para dor crônica decorre de alterações lentas nas etapas fisiopatológicas e histopatológicas. A dor aguda permanece por algumas semanas, enquanto a dor crônica é contínua e pode durar meses ou anos (KAPUR *et al.*, 2014). A dor crônica, na maioria das vezes, é gerada por lesão ou doença, podendo ser perpetuada por fatores que não são gerados por causadores primários (LOESER e MELZACK, 1999; ZIMMERMANN, 2001; MENDELL e SAHENK, 2003). É definida como uma dor que persiste por mais de 3 meses e o método mais comum de controle é o uso de fármacos (KINGSLEY *et al.*, 2014). Atualmente, a dor crônica vem gerando um problema na saúde pública mundial, em consequência ao aumento da população de idosos. Estima-se que mundialmente milhões de dólares são gastos anualmente para o tratamento desse tipo de dor (CHOW *et al.*, 2009). Este tipo de dor possui sensibilidade anormal a estímulos mecânicos e térmicos, podendo levar à hiperalgesia que é uma reação excessiva para um estímulo normalmente doloroso ou à alodínia que é uma resposta dolorosa causada por estímulos que normalmente não causariam dor (MARTINS, 2014).

Os neurônios sensoriais utilizam os aminoácidos excitatórios como neurotransmissor, principalmente o glutamato, que é encontrado em grandes quantidades no SNC, apresenta um papel fundamental na transmissão da informação nociceptiva da medula espinal até os centros superiores (MILLAN, 1999; BLEAKMAN *et al.*, 2006). O glutamato exerce suas ações por meio de dois grupos distintos de receptores, um formado por receptores acoplados a canais iônicos chamados ionotrópicos e outro formado por receptores acoplados à proteína G, denominados metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos glutamatérgicos compreendem os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), cainato e α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA), que são canais iônicos permeáveis ao cálcio, sódio e potássio (DICKENSON, 1997). Estudos demonstram que os receptores NMDA, são formados por diferentes

subunidades e são amplamente distribuídos no SNC (MARVIZON *et al.*, 2002; BLEAKMAN *et al.*, 2006).

Os receptores kainato, assim como os NMDA, encontram-se amplamente distribuídos no SNC, incluindo o corno dorsal da medula, principalmente, nas fibras não mielinizadas e pouco mielinizadas, podendo modular a liberação de GABA em neurônios inibitórios (PALECEK *et al.*, 2004; BLEAKMAN *et al.*, 2006). Já o receptor AMPA é altamente permeável aos íons de sódio, despolarizando assim, os neurônios de segunda ordem e conduzindo o estímulo até o tálamo. Esses receptores são os primeiros a serem ativados em qualquer fenda sináptica frente à liberação de glutamato, decorrendo dele a ativação de outros receptores, como, por exemplo, o NMDA, que promove a remoção do íon magnésio que obstrui seu poro (MILLAN, 2002). Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR) dividem-se em oito subtipos classificados em três subgrupos de acordo com sua homologia e mecanismo de transdução de sinal: o grupo I (mGluR 1 e 5) promove ativação da via da fosfolipase C; o grupo II (mGluR 2 e 3) e o grupo III (mGluR 4, 6, 7 e 8) estão acoplados negativamente à adenilato ciclase (DHAMI e FERGUSON, 2006).

O organismo possui mecanismos intrínsecos de controle da dor, pois após a estimulação dos diferentes núcleos do tálamo, os sinais são transmitidos para diversas áreas do córtex sensorial somático, substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo, amígdala e cerebelo. Um circuito modulador endógeno descendente conectando a substância cinzenta periaquedutal e o corno dorsal da medula é responsável pela ativação de conexões que promovem facilitação ou inibição da nocicepção. Entretanto, esse sistema não age simplesmente facilitando ou inibindo, uma vez que cada estímulo induz a um tipo diferente de resposta devido à plasticidade do sistema. Os sistemas de neurotransmissão mais estudados nesta conexão são os sistemas glutamatérgico, GABAérgico, neuropeptidérgico, serotoninérgico, opioidérgico e adrenérgico, dentre outros (MILLAN, 2002; VANEGAS e SCHAIBLE, 2004).

Os neurotransmissores inibitórios mais importantes são os opióides, noradrenalina, serotonina, GABA e glicina (FORNASARI e COACCIOLI, 2014). O sistema opióide na inibição da nocicepção age por duas vias principais, a central e a periférica. Na via central, têm-se os agonistas opióides, endógenos, os quais atuam sobre a substância cinzenta periaquedutal, bulbo

rostroventromedial e corno dorsal da medula espinal, ativando a via de controle descendente da dor, acionando os canais de potássio e inibindo canais de cálcio dependentes de tensão elétrica (MILLAN, 1999). Perifericamente, tem se proposto que agonistas μ -opióides inibem a ativação da adenilato ciclase, aumentam o fluxo de íons de potássio para dentro da célula e inibem a condutância de íons de cálcio em neurônios aferentes primários, e são a maioria, 70% dos receptores no corno dorsal da medula espinal e nos terminais centrais. Enquanto agonistas de receptores δ e κ opióides correspondem a 30% e estão localizados nos neurônios de segunda ordem espinotalâmico e interneurônios, que inibem a secreção de substâncias pró-inflamatórias por neurônios simpáticos (KIM *et al.*, 2008; FORNASARI e COACCIOLI, 2014). Os opióides endógenos são a β -endorfina, as encefalinas e as dinorfinas (FORNASARI e COACCIOLI, 2014).

A serotonina (5HT, 5-hidroxitriptamina) é uma monoamina que também está envolvida na estimulação das vias descendentes de controle da dor. Estudos vêm demonstrando que a estimulação de áreas relacionadas à analgesia está associada à elevação dos níveis de serotonina (BASBAUM, 1981). Está bem estabelecido que as vias serotoninérgicas no SNC originam-se dos núcleos da rafe, os quais representam uma rica fonte de serotonina neuronal em mamíferos (FIELDS *et al.*, 1991; MILLAN, 2002). O núcleo dorsal da rafe tem sido implicado nos efeitos regulatórios de antidepressivos nos transtornos de humor (ARTIGAS *et al.*, 1996), assim como na modulação da dor (MILLAN, 2002). Já o núcleo magno da rafe é o núcleo serotoninérgico mais importante na modulação do controle descendente da transmissão da dor (FIELDS *et al.*, 1991; MILLAN, 2002). Além disso, vários estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado que medicamentos antidepressivos tricíclicos e inibidores da recaptação de 5-HT são capazes de produzir marcante analgesia tanto em humanos quanto em animais (CARTER e SULLIVAN, 2002; MILLAN, 2002). Evidências sugerem que os subtipos de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₂ e 5-HT₃ modulam a transmissão nociceptiva (BARDIN *et al.*, 2000; MILLAN, 2002). Outro grupo de receptores que desempenham um papel importante nos mecanismos analgésicos endógenos são os adrenérgicos (α 1, α 2 e β -adrenoceptores), classe ligada à proteína G. A via adrenérgica projeta-se a partir do corno dorsal da medula até a ponte (PARK *et al.*, 2013).

O ATP é um transmissor liberado após um estímulo mecânico, elétrico ou térmico, que se liga aos receptores purinérgicos P2X e P2Y e é rapidamente degradado em adenosina. Essa substância endógena, a adenosina, atua na modulação da dor e seu principal receptor com ação antinociceptiva é a adenosina A1. A adenosina quando injetada intratecalmente é responsável por reduzir a alodínia e a hiperalgesia em pacientes com dor crônica (GOLDMAN *et al.*, 2010).

2.2 INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma reação do tecido vivo diante de uma agressão local, podendo ser agressão física (queimadura, trauma ou radiação), química (ácido ou substância cáustica) e biológica (microorganismos) (CARVALHO, 1998; LINS, 2010). Assim, a inflamação é uma resposta adaptativa para restaurar a homeostase do organismo, independentemente da sua causa (MEDZHITOV, 2008). O processo inflamatório serve para eliminar o agente agressor por intermédio de uma série de processos biológicos responsáveis por reconstituem o tecido lesado (MEDZHITOV, 2008; VALLEJO *et al.*, 2010). A inflamação aguda é caracterizada por vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, exudação de fluido rico em proteínas (plasma) e a migração de células, podendo permanecer por horas ou dias (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Clinicamente, é caracterizada por cinco sinais clássicos: rubor (vasodilatação), edema (exsudação de fluido e aumento da permeabilidade), calor (aumento do metabolismo celular), dor e perda da função (GALLIN *et al.*, 1982; BOSCHI *et al.*, 2008; CASTARDO *et al.*, 2008; SERHAN *et al.*, 2008). O calor e o rubor são uma resposta inicial clássica da inflamação aguda a uma ação vasodilatadora a fim de facilitar a chegada das células inflamatórias no local da lesão; a formação do edema é ocasionada pelo influxo de proteínas da região vascular para o espaço intersticial. Ambos são responsáveis pela marginação, adesão e migração dos leucócitos (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A inflamação envolve a participação de diversos sistemas, mediadores e células especializadas. Entre os principais, destacam-se os sistemas do complemento, de coagulação, de reparo e angiogênese. Dentre as células, pode-se citar as células do sistema imune, como linfócitos, neutrófilos,

mastócitos e, principalmente, os macrófagos, que são responsáveis pela liberação de uma gama de mediadores e radicais livres que contribuirão para o processo inflamatório (HAVSTEEN, 2002). Os neutrófilos merecem destaque neste processo, pois são os primeiros a migrarem dos vasos sanguíneos e chegarem ao sítio da lesão. O processo de transmigração dos neutrófilos acontece em várias etapas: marginação, rolamento, aderência, diapedese e quimiotaxia (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). A marginação é um movimento dessas células da corrente sanguínea para a periferia, por meio do processo de rolamento, aderência e transmigração (diapedese). Desta maneira, os neutrófilos atingem o local da lesão realizando a quimiotaxia, fagocitose e apoptose das bactérias, através da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; SERHAN *et al.*, 2008). Durante o processo inflamatório, ocorre a liberação de vários mediadores inflamatórios, tais como peptídios (bradicinina), lipídios (prostaglandinas), neurotransmissores (ATP), prótons e neurotrofinas (NGF).

Alguns deles excitam os nociceptores, gerando sensações dolorosas. Segundo Medzhitov (2008), os mediadores inflamatórios são classificados de acordo com suas propriedades bioquímicas, em sete grupos: aminas vasoativas (histamina e serotonina), peptídios vasoativos (substância P), componentes do sistema de complemento (C3a, C4a e C5a), citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-6 e muitas outras), mediadores lipídicos (leucotrienos e prostaglandinas), quimiocinas e enzimas proteolíticas (MEDZHITOV, 2008). As aminas vasoativas, a histamina e a serotonina, possuem um efeito sobre os vasos sanguíneos, aumentando o fluxo sanguíneo local e a permeabilidade dos capilares e vênulas à água e às proteínas, responsável pela formação de edema (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; MEDZHITOV, 2008). A substância P, um neuropeptídeo vasoativo é liberado pelos neurônios sensoriais e possui a função de vasodilatação e hiperalgesia (MEDZHITOV, 2008). A liberação de neuropeptídeos nos neurônios periféricos leva a um extravasamento plasmático de novos mediadores e quimiotaxia de células inflamatórias. Este processo é chamado de "inflamação neurogênica" (MCNAUGHTON, 2010). A lesão tecidual promove a liberação das citocinas inflamatórias, principalmente através dos macrófagos e mastócitos. As citocinas merecem destaque porque, entre outras ações, permitem ao macrófago eliminar os microrganismos (MASFERRER *et al.*,

1994; ALVES *et al.*, 2013). As citocinas pró-inflamatórias possuem uma importante função na dor inflamatória e em outros eventos do processo inflamatório, como a migração dos leucócitos e eliminação dos agentes invasores liberando um conteúdo tóxico que incluem as ROS (MEDZHITOV, 2008). Alguns exemplos de citocinas pró-inflamatórias são: a interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-6 e IL-8 (VERRI JR., 2007). O TNF- α é produzido pelo macrófago em resposta ao patógeno e seu aumento local gera calor, edema, dor e vermelhidão durante a inflamação, esta citocina amplia e prolonga a resposta inflamatória. As citocinas IL-1 β e IL-6 são produzidas por vários tipos de células, especialmente por macrófagos e mastócitos. Elas têm papéis importantes na resposta inflamatória, incluindo a ativação do endotélio e de leucócitos e indução da resposta inflamatória (TRACEY, 2002; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Outros mediadores inflamatórios são os eicosanóides responsáveis pela geração da inflamação e dor. São estes os leucotrienos e as prostaglandinas. Os eicosanóides são produtos do ácido araquidônico, constituinte do fosfolípídeos de membrana, o qual é metabolizado pelas ciclooxigenases (COX1 e COX2) e gera as prostaglandinas (PGs) e tromboxanas (TXs) ou metabolizado pela lipoxigenases gera os leucotrienos (MEDZHITOV, 2008). As PGs desempenham um papel fundamental na formação da resposta inflamatória. Sua síntese é aumentada no tecido inflamado e elas contribuem no aparecimento dos sinais cardinais da inflamação aguda (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011). Existem quatro principais biotipos de PGs geradas *in vivo*: prostanglandina E₂ (PGE₂), prostaciclina (PGI₂), prostaglandina D₂ (PGD₂) e prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α}) (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011). Na inflamação, a PGE₂ é uma das responsáveis pela sensação de dor, vermelhidão e edema, resultados de uma vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (MASFERRER *et al.*, 1994; RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011). Conforme já citado, além das prostaglandinas, outros mediadores inflamatórios contribuem para a sensibilização dos nociceptores, bem como para a inflamação e o processo de recuperação (JULIUS e BASBAUM, 2001; GRIFFIS *et al.*, 2006). A resposta bem sucedida à inflamação aguda, após a eliminação do patógeno, é seguida por uma fase de resolução e reparo do tecido lesado (MEDZHITOV, 2008). Ou seja, ocorre uma substituição do tecido morto ou danificado por um novo tecido

idêntico ao anterior da lesão, caracterizando uma regeneração ou uma neoformação do tecido conjuntivo, caracterizando uma cicatrização (LINS, 2010).

No entanto, em alguns casos, o processo inflamatório deixa de ser uma defesa benéfica, adquire novas características e torna-se crônico (MEDZHITOV, 2008). Uma vez removidos os materiais nocivos por meio da fagocitose, o processo inflamatório deve ser resolvido para evitar a propagação da inflamação, tornando-se crônico ou com aparecimento de doença (SERHAN *et al.*, 2008). Doenças como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e aterosclerose, dentre outras, são resultados de inflamação crônica. Isso decorre de alterações neuroplásticas que começam pela lesão inicial, mas que resultam em eventos que perpetuam o quadro inflamatório, por semanas, meses ou anos, mesmo tendo a lesão primária cicatrizada (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Nessas condições, a inflamação perde sua característica de proteção e torna-se doença. A grande preocupação na busca dos mecanismos que envolvem a inflamação é devido a sua participação em doenças crônicas, incluindo câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e reumatológicas (NAGRA *et al.*, 1997; MIDDLETON *et al.*, 2000; HAVSTEEN, 2002; KAMIYA *et al.*, 2003; MCNAUGHTON, 2010).

2.3 LASER

O LASER emite luz gerada pela alta intensidade de um meio, que pode ser gasoso, líquido, cristal, corante, ou semiconductor (CHOW *et al.*, 2009). Esta luz é constituída por feixes coerentes de comprimentos de onda individuais no espectro eletromagnético visível ou invisível, a qual pode ser emitida em um modo pulsado ou contínuo de onda (CHOW *et al.*, 2009).

O termo 'LASER' é um acrônimo para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (amplificação de luz por meio da emissão estimulada de radiação), sua luz pode ser utilizada para estimular reações fisiológicas nos tecidos. Embora Albert Einstein, em 1917, a partir da Lei de Planck, tenha delimitado os princípios subjacentes à geração deste tipo de luz, foi em 1960 que o primeiro equipamento LASER foi desenvolvido por Theodore H. Maiman. A idéia inicial para a produção do LASER ocorreu com o emprego de um material

sólido (cristal de rubi). Esta tecnologia foi introduzida na Medicina para fotocoagulação na retina (COLLS, 1984; BAXTER, 1994; ROUND *et al.*, 2013). Benett e Herriot, em 1960, construíram o LASER de hélio-neônio, sendo a primeira fonte de luz a estar disponível comercialmente, recebendo o nome de *soft* LASER (AVCI *et al.*, 2013). Em 1967, Endre Mester, pesquisou se a radiação LASER poderia causar câncer em camundongos. Ele raspou os pelos na região dorsal do animal e aplicou LASER de rubi (694 nm) em um grupo. Os animais não desenvolveram câncer, mas Mester percebeu que no grupo tratado, os pelos cresceram mais rapidamente comparado com o grupo não tratado. Este foi o primeiro experimento que demonstrou o efeito da fotobioestimulação (AVCI *et al.*, 2013). No final da década de 70 surgiram os LASER de arseneto de gálio (AsGa) e de arseneto de gálio-alumínio (AsGaAl) (BAXTER, 1994).

Desde então, o LASER vem sendo utilizado em muitas áreas médicas para cicatrização, redução da dor e inflamação (ARTES-RIBAS *et al.*, 2013). Atualmente, essa terapia é utilizada em diversas áreas da medicina como: dermatologia, oftalmologia, otorrinolaringologia e em cirurgias gerais e vasculares (ROUND *et al.*, 2013).

Os LASER são classificados de acordo com sua potência, principalmente, em baixa e alta intensidade. Porém, quando o propósito tem finalidade terapêutica, utiliza-se os LASER de baixa intensidade, cujas ondas eletromagnéticas possuem propriedades fisiológicas de penetrar os tecidos e induzir uma ação fotobiológica produzindo efeitos bioquímicos, biológicos e bioenergéticos (CABRERA, 2002; CATÃO, 2004). Os resultados dos estudos indicam um potencial importante da radiação LASER de baixa intensidade, quando aplicada nos tecidos, chamada de fotobioestimulação, que produz principalmente regeneração dos tecidos (MESTER *et al.*, 1985). Desde a concepção, o LASER de baixa potência vem mostrando grande importância terapêutica, principalmente em distúrbios musculoesqueléticos agudos e crônicos, edema, inflamações, ulcerações, queimaduras e analgesia (PINTO, 2011). A terapia LASER de baixa potência, fotobioestimulação ou fototerapia, corresponde ao uso de fótons para alterar as atividades biológicas dos tecidos (AVCI *et al.*, 2013). Porém, alguns estudos empregando LASER questionam a sua eficácia devido ao número de ensaios inconclusivos e ineficazes (KATSOULIS *et al.*, 2010; JANG e LEE, 2012).

2.3.1 Princípios Físicos

A produção da radiação LASER ocorre quando um átomo recebe energia e ocorre a passagem de um elétron da sua camada normal para uma camada superior externa tornando-se instável. Como este estado não é normal, existe uma tendência deste elétron a voltar para sua camada de origem, o que produz um fóton de energia unidirecional em forma de onda eletromagnética. Este fenômeno é conhecido como emissão espontânea de radiação. Quando a fonte energética fornece mais energia a um átomo, que já está em um estado instável (excitado), este libera, então, dois fótons com as mesmas características do feixe incidente, caracterizando a emissão estimulada de radiação (BAXTER, 1994). Este processo leva à produção do LASER, o qual se realiza por estar em uma cavidade, composta por dois espelhos cuidadosamente alinhados, para que a radiação reflita de um dos lados ao outro espelho, possibilitando a emissão de um feixe luminoso (PIMENTA, 1990).

Nessas circunstâncias, o elétron libera seu excesso de energia como um fóton de luz sincronizado (BAXTER, 1994). As radiações geradas pelos equipamentos de LASER apresentam quatro características:

- (1) monocromaticidade: a luz produzida é de cor única, sendo a maior parte da radiação emitida pelo dispositivo de tratamento agrupado em torno de um único comprimento de onda com uma largura de banda muito estreita. Este parâmetro é um fator crítico na determinação dos efeitos terapêuticos produzidos pelo LASER;
- (2) colimação: os fótons produzidos pelos equipamentos de LASER quase não possuem divergência da radiação emitida com a distância, permanecem com o mesmo feixe; essa propriedade mantém uma área relativamente pequena para distâncias consideráveis, mesmo quando passando através dos tecidos;
- (3) coerência: a luz emitida apresenta uma mesma fase; as depressões e picos das ondas combinam-se no espaço e no tempo, ou seja, possuem sincronismo e possuem o mesmo comprimento de onda (CATÃO, 2004);
- (4) polarização: ocorre quando as ondas de luz estão orientadas em um só plano, de tal modo que as vibrações em seus campos elétricos aconteçam em uma única direção (BAXTER, 1994).

Diversos são os parâmetros que descrevem a radiação emitida pelos equipamentos de LASER, dentre eles: o comprimento de onda, que consiste na distância entre dois picos de uma onda (um ciclo), cuja unidade é expressa em nanômetros (nm); a potência, que é a energia emitida por segundo, cuja unidade é expressa em watts (W); a densidade de potência, que é definida como a potência de saída da luz por unidade de área de irradiação, cuja unidade é expressa em watts por centímetro quadrado (W/cm^2) e a densidade de energia, que expressa a dose emitida em joule por centímetro quadrado (J/cm^2), entre outros descritos no Quadro 1. Esses fatores são importantes nos efeitos fisiológicos da radiação LASER, pois determinam principalmente a absorção da radiação pelas biomoléculas e a sua profundidade de penetração (COLLS, 1984; BAXTER, 1994; TUNER, 1999). Jang e Lee (2012) relatam que além da definição do comprimento de onda, potência, densidade de potência e dose, existem outros parâmetros importantes como modo emissão (contínuo ou pulsado), distância entre a caneta e pele, número de sessões realizadas e a área sob radiação (cm^2) (JANG e LEE, 2012).

Quadro 1: Parâmetros da Terapia Laser de Baixa potência. Adaptada de Huang *et al.*, 2009.

Parâmetro	Unidade	Comentários
Comprimento de onda	Nm	Distância entre cristas sucessivas em uma onda
Densidade de potência	W/cm^2	Potência óptica por unidade de área irradiada
Estrutura de pulso	Pico de Potência (W) Frequência do Pulso (Hz) Largura do pulso (s) Ciclo de Trabalho (%)	Se o feixe é pulsado, a potência deve ser a média dos pulsos, calculada da seguinte forma $Potência = Pico\ de\ Potência \times Largura\ do\ pulso \times Frequência\ do\ Pulso$
Coerência	A coerência depende da banda espectral	Desempenha uma ação importante na fotobiomodulação das células
Polarização	Polarização linear ou circular	A luz polarizada tem efeitos diferentes da luz não polarizada: a polarizada é rapidamente absorvida e ligeiramente espalhada no tecido

A radiação LASER penetra no tecido humano em várias profundidades, sendo que a maior parte é absorvida nos primeiros milímetros do tecido. Segundo Ozawa *et al.* (1998), a maior efetividade de penetração dos tecidos ocorre no comprimento de onda de 830 nm (OZAWA *et al.*, 1998).

A terapia LASER de baixa intensidade ou de baixa potência é um termo genérico que define a aplicação terapêutica de LASERs e diodos super luminosos monocromáticos com potência relativamente baixa (< 500 mW), para tratamento de doenças e lesões e utilizando doses consideradas baixas demais (normalmente < 35 J/cm²) para produzir qualquer aquecimento detectável nos tecidos irradiados (BAXTER, 1994). Os LASERs terapêuticos apresentam comprimentos de onda na faixa visível e infravermelha. O de emissão visível atua na faixa de 632,8 nm. As emissões de radiação infravermelha estão compreendidas entre os comprimentos de onda de 730 nm e 1300 nm, produzidos a partir do Arseneto de Gálio (AsGa) e do Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) (BAXTER, 1994).

Os LASERs mais utilizados na LA são Hélio-Neônio (HeNe) com comprimento de onda de 632,8 nm, o Argônio no comprimento de 514 nm, AsGaAl em 780 ou 830 nm, o AsGa em 904 nm e, recentemente, o ultra-violeta 405 nm (ROUND *et al.*, 2013).

O quadro 2 relaciona equipamentos LASER de várias potências, diferentes tipos de emissão, seus respectivos comprimentos de onda, tipos de pulso e indicações de aplicação na área de saúde.

Quadro 2: tipos de emissão, comprimentos de onda, pulso e indicações.

MATERIAL	COMPRIMENTO DE ONDA (nm)	REGIME DE PULSO	INDICAÇÃO
Rubi	694	Pulsado/Contínuo	Remoção de tatuagem
Alexandrite	755	Pulsado	Remoção de pelos
Neodímio-YAG	1064	Pulsado	Coagulação de tumores
Hólmio-YAG	2130	Pulsado	Endodontia
Érbio-YAG	2940	Pulsado	<i>Peeling</i> facial
AlGaInP	630-685	Contínuo	Bioestimulante
AsGaAl	780-870	Contínuo	Bioestimulante
AsGa	904	Contínuo /Pulsado	Bioestimulante
Exímeros	193/248/308	Pulsado	Cirurgia vascular e oftálmica
Argonio	350-514	Contínuo	Cirurgia vascular e oftálmica
Vapor de Cobre	578	Pulsado/Contínuo	Cirurgia oftálmica e dermatológica
HeNe	632,8	Contínuo	Bioestimulante
CO ₂	IR 9.4 e 10.6	Pulsado/Contínuo	Cirurgia Dermatológica

Fonte: TUNER e HODE, 1999.

Segundo Avci *et al.* (2013), os comprimentos de onda na faixa de 390-600 nm são utilizados para o tratamento dos tecidos superficiais e para os tecidos profundos são utilizados os LASERs de comprimento de onda de 600-940 nm, conforme ilustrado na figura 4.

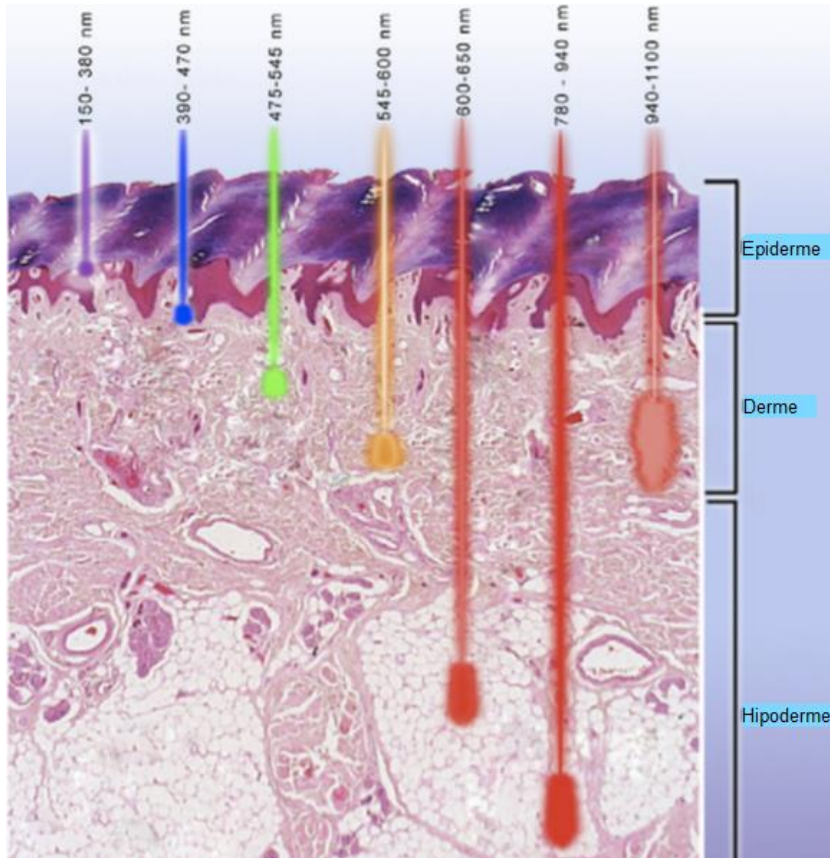


Figura 4: Profundidade de penetração do LASER na pele nos diferentes tipos de comprimento de onda (figura adaptada de Avci *et al.*, 2013).

2.3.2 Efeitos Fisiológicos

O organismo possui uma função fotorreguladora a partir de fotorreceptores, capaz de absorver um fóton de determinado comprimento de onda, chamado de cromóforo, que é uma biomolécula capaz de ser excitada pelos fótons gerando atividades funcional e metabólica na célula (KARU, 1999).

O LASER de baixa potência, pela ação de absorção dos cromóforos, possui importantes efeitos celulares como: bioquímicos, bioelétricos e biofísicos. Dentre eles, pode-se citar a troca de potenciais de membrana, o equilíbrio da bomba sódio e potássio, a repolarização e a hiperpolarização da membrana, o aumento do potencial de ação nervoso, o estímulo à microcirculação, a absorção

de exudatos e a interferência na síntese de prostaglandinas, a aceleração dos processos metabólicos celulares e o aumento da síntese de ATP (PÉREZ, 2000; BARATTO *et al.*, 2011). A principal aplicação do LASER de baixa potência nos tecidos é produzir numerosos fenômenos bioquímicos e biológicos, proporcionando efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e de cicatrização em diferentes tecidos e nervos (CATÃO, 2004). Os efeitos celulares da fototerapia são classificados em primários, secundários e terciários. Os efeitos primários são a absorção dos fótons pelos cromóforos encontrados nas mitocôndrias; os secundários ocorrem nas reações celulares, como alterações na permeabilidade da membrana celular; e os terciários são os efeitos sistêmicos, como analgesia, vasodilatação, redução do edema e cicatrização de feridas (HAWKINS e ABRAHAMSE, 2007; ARTES-RIBAS *et al.*, 2013). Uma das explicações do mecanismo biológico do efeito proporcionado pelo LASER é a absorção da luz na faixa do espectro do infravermelho e vermelho por cromóforos, principalmente o citocromo c oxidase ou complexo IV localizado dentro da mitocôndria, na cadeia respiratória (AVCI *et al.*, 2013). Estes têm a função de transformar ADP em ATP, a absorção do feixe luminoso resulta em um aumento na síntese de ATP, bem como da concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que se formam durante o processo de redução de oxigênio. Por sua vez, o LASER altera o estado redox celular, ativando numerosas vias de sinalização intracelular e aumenta a afinidade dos fatores de transcrição na proliferação e sobrevivência celular, assim como na reparação e regeneração de tecidos (Figura 5) (AVCI *et al.*, 2013).

O efeito anti-inflamatório é ocasionado pela ação inibitória do LASER de baixa potência sobre o processo inflamatório e é explicado pela promoção dos quatro principais efeitos: inibição dos fatores quimiotáticos nas primeiras etapas da lesão (ativação de monócitos e macrófagos), interferência nos mediadores químicos ou superóxidos induzidos pela inflamação, diminuição do volume do exudato alternando a permeabilidade vascular e a normalização da permeabilidade da membrana. Estudos experimentais em laboratório têm sugerido a ação antiinflamatória do LASER pela da inibição da ciclooxigenase 2 (COX-2) e redução dos níveis da PG2.

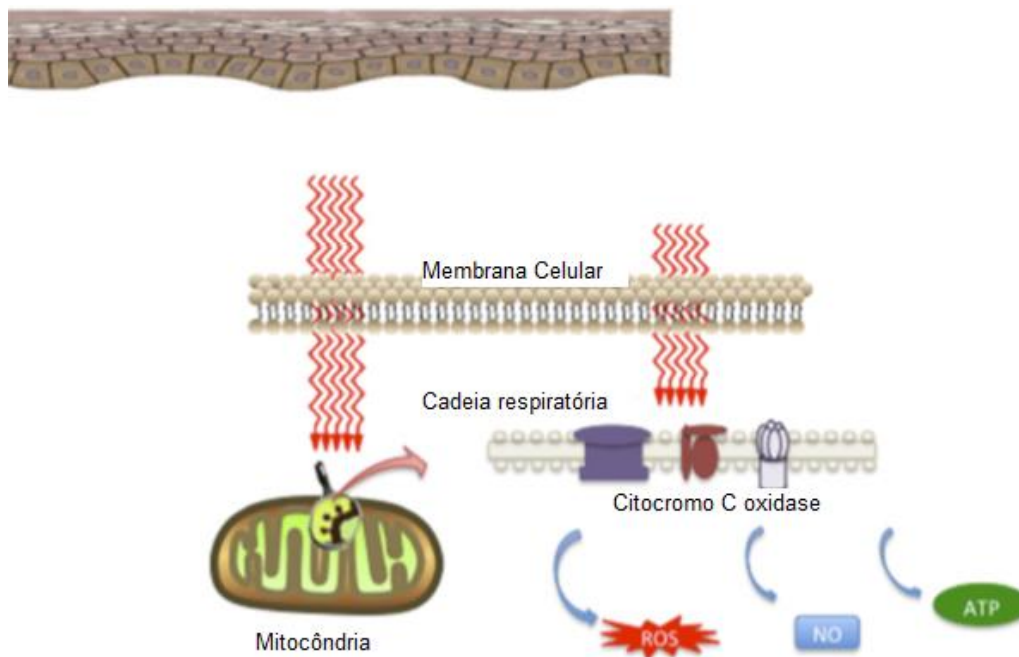


Figura 5: Mecanismo de ação da terapia LASER. O mecanismo inicia-se com a absorção da luz vermelha e infravermelha pelos cromóforos mitocondriais em particular o citocromo C oxidase, que aumenta os processos de bioestimulação (adaptada de AVCI et al., 2013).

A terapia LASER para o alívio da dor tem sido usada há mais de 30 anos como um método não invasivo e atérmico, tornando-se e cada vez mais popular (JANG e LEE, 2012). Vários estudos anteriores, em diferentes áreas, tem demonstrado que o LASER é eficaz no sintoma da dor (ARTES-RIBAS *et al.*, 2013). Várias propostas do seu efeito analgésico têm sido sugeridas, como mecanismos relacionados ao relaxamento muscular e à liberação de opióides endógenos. Então, o LASER de baixa potência produz o efeito analgésico por meio do aumento da síntese de endorfinas endógenas (β -endorfina), e diminuição da atividade das fibras C (FABRE *et al.*, 2015). Segundo Suaréz *et al.* (2003), o efeito analgésico é produzido pela troca de potencial de membrana e equilíbrio da bomba de Na^+/K^+ -ATPase devido à repolarização e da hiperpolarização da membrana, previamente despolarizada na situação de dor (SUÁREZ, 2003). Autores como Pinto (2011), também relatam que a ação analgésica do LASER ocorre por um equilíbrio e favorecimento da produção de peptídios endógenos e pela alteração elétrica celular, interrompendo a propagação da dor. O LASER também atua na diminuição da inflamação e da dor por meio da reabsorção de exsudatos inflamatórios favorecendo, desta forma, a eliminação de substâncias como bradicinina, histamina e acetilcolina, e a redução de citocinas e da enzima COX2 (ARTES-RIBAS *et al.*, 2013). Ártes-

Ribas *et al.* (2013) propõem três hipóteses para o efeito analgésico do LASER: (1) redução da dor pela modulação do processo inflamatório, (2) alteração da condução do potencial de ação nas vias periféricas e (3) aumento de produção da endorfina endógena (ARTES-RIBAS *et al.*, 2013). Porém, segundo Jang e Lee (2012), o efeito dessa terapia na redução da dor ainda é duvidoso e controverso, devido a inúmeros ensaios clínicos denotarem resultados significativos de ineficácia (JANG e LEE, 2012).

Outro efeito descrito na teoria é o de cicatrização. A radiação emitida pelo equipamento de baixa potência age sobre a proliferação celular, atuando nos processos de reparação tecidual. O seu efeito bioestimulante no processo de cicatrização ocorre por meio do aumento de macrófagos, de granulação de mastócitos, angiogênese, aumento da atividade fagocitária e aumento de fibroblastos, aumento da produção do colágeno e formação do tecido conjuntivo (LINS, 2010; FABRE *et al.*, 2015).

O uso do LASER é eficiente mas depende de uma correta dosificação. Colls (1984) determina algumas doses em função do efeito desejado: efeito antiálgico, de 2 a 4 J/cm²; antiinflamatório, de 1 a 3 J/cm²; regenerativo, de 3 a 6 J/cm²; circulatório, de 1 a 3 J/cm². Este mesmo autor classifica os níveis de dose conforme o estágio do processo inflamatório: agudo (1 a 3 J/cm²); subagudo (3 a 4 J/cm²) e crônicos (5 a 7 J/cm²). Já Turner e Rode (2004) relataram o alívio da dor obtido com intensidades entre 3 e 4 J/cm².

A redução da dor ou de espasmos musculares é um dos objetivos do tratamento com tecnologia LASER, por meio da qual se irradia um feixe de luz na pele ativando a raiz nervosa e levando a uma resposta sobre locais da dor (BAXTER, 1994). Similarmente, a irradiação de LASER nos locais onde há maior quantidade de terminações nervosas livres pode também ser benéfica para tratamento da dor, pois envia o estímulo diretamente para dentro da distribuição sensorial do nervo, depois para o sistema nervoso simpático, desta maneira, proporcionando melhora de sintomas.

Usualmente, a aplicação do LASER de baixa potência é indicada para lesões ou dores localizadas, mas vários autores têm recomendado seu uso em tratamentos nos pontos de acupuntura como terapêutica, principalmente para o alívio da dor (BAXTER, 1994). Existem hipóteses sobre o mecanismo fisiológico de ação do LASER, principalmente relacionadas com a cadeia respiratória na

mitocôndria; porém, são aplicações direcionadas no local da dor ou da inflamação, técnica terapêutica normalmente ocorre na fisioterapia. Diferentemente da LA, que é realizada sobre os pontos de acupuntura, os quais não precisam estar no mesmo local da lesão ou da sintomatologia. A LA é uma das técnicas da medicina tradicional chinesa que utiliza equipamentos LASER de baixa potência, no comprimento de onda que varia do ultravioleta ao infravermelho, para a estimulação dos acupontos com efeitos não térmicos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). Os trabalhos iniciais, no ocidente, com a terapia de baixa potência começaram no ano de 1970, com o Dr. Friedrich Plog, do Canadá, baseado no sistema de LASER HeNe, que desenvolveu especificamente um equipamento para tratamento com a técnica da acupuntura chamado Akuplas, e sugeriu o uso do LASER para estimulação dos acupontos no corpo, no tratamento de hipertensão e asma (WHITTAKER, 2004; ROUND *et al.*, 2013; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). Outros países como Japão e a Rússia utilizam o LASER com sucesso na aplicação de acupontos para sintomas de doenças como exoftalmia, hipertireoidismo, inflamação pélvica e, principalmente, para o alívio da dor (BAXTER, 1994). A China começou a utilizar o LASER na substituição das agulhas, em 1979, por meio de um cirurgião chamado Zhou, no processo de anestesia (ROUND *et al.*, 2013).

Após este momento, iniciaram-se as aplicações do LASER de baixa potência em diversos experimentos e tratamentos. Embora a terapêutica da acupuntura à LASER tenha se expandido rapidamente na população, a avaliação de sua eficácia é considerada como difícil devido à ausência de descrições exatas de todos os seus parâmetros, como comprimento de onda, potência e intensidade (WHITTAKER, 2004).

Segundo Stux e Hammerschlag (2005), a utilização do LASER pode substituir o uso das agulhas metálicas com a mesma eficácia. A acupuntura vem empregando o LASER por possuir vantagens em relação à aplicação tradicional porque seu procedimento não gera sensação dolorosa, não é traumático, não invasivo e facilmente aplicado. O mecanismo geral do efeito terapêutico do LASER de baixa potência na acupuntura não é completamente compreendido e, por isso, considerado duvidoso (STUX, 2005). Porém, os pacientes relatam como resposta a este tratamento uma sensação de calor, formigamento, ferroadada ou agulhada (BAXTER, 1994). Evidências do efeito da acupuntura

utilizando fotoestimulação foram descritas em uma publicação sobre a ativação da área cortical visual após sua aplicação no acuponto B67, por meio de imagens de ressonância magnética (WHITTAKER, 2004).

O LASER mais utilizado na acupuntura é o de AsGaAl, cujo comprimento de onda varia de 780 a 870 nm e potência de 20 a 100 mW, com saída contínua ou pulsada, atingindo seu pico de penetração entre 2 e 3 cm (WHITTAKER, 2004; LITSCHER, 2012). Os comprimentos de onda entre 810 nm e 840 nm apresentam maior profundidade de penetração, enquanto os LASERs AsGa e AsGaAl alcançam a profundidade média de 20 a 50 mm, fazendo com que os cromóforos superficiais, que são biomoléculas capazes de serem excitadas por fótons incidentes, transformem a energia em efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos (BAXTER, 1994). Segundo Ghottschling *et al.* (2008), em experimentos com crianças portadoras de cefaléias severas, utilizou o LASER em pontos de acupuntura, com um comprimento de onda de 830 nm e uma potência de 30 mW, produzindo resultado significativo ($p < 0,0001$) comparado ao placebo (GOTTSCHLING *et al.*, 2008). Demonstrou-se que o efeito fisiológico do LASER, além da inibição da bomba Na^+/K^+ -ATPase, exercendo influência no potencial de ação das células, pode induzir um bloqueio reversível no transporte mitocondrial, resultando na diminuição de neurotransmissão nas fibras A δ e C responsáveis pela condução da dor.

Novoselova e colaboradores (2006), em experimento com camundongos, utilizaram o equipamento LASER HeNe, com a potência de 0,2 mW/cm² e o comprimento de onda de 632,8 nm, durante 30 dias, e observaram a produção do NO (óxido nítrico) e citocinas na imunoterapia (NOVOSELOVA, 2006). O estudo demonstrou que a exposição constante ao LASER diminuiu a produção de NO nos macrófagos. Além disso, Baratto *et al.* (2011), em sua revisão, relata estudos que obtiveram redução do edema em modelos de inflamação aguda e hiperalgesia na indução de carragenina e inflamação crônica na indução do Complexo adjuvante Freund's (CFA), a partir dos comprimentos de onda de 633 e 670 nm.

A aplicabilidade do LASER de arseneto de gálio (infravermelho) de baixa potência, em modelos animais, produziu nas células imunes um aumento na produção de citocinas, NO, proteínas de proteção e oxigênio. Esses efeitos

dependem de sua energia, da banda espectral à qual ele pertence, seu regime de funcionamento e suas qualidades de coerência (EBNESHAHIDI *et al.*, 2005).

Ferreira e colaboradores relataram que o LASER exerce a mesma eficiência do estímulo produzido pelas agulhas quando aplicadas nos acupontos. Em seus dados experimentais, obtiveram uma melhora no tratamento de meduloblastoma, como trismo e paralisia facial, com LA na auriculoterapia (FERREIRA, 2014). Alguns autores vêm pesquisando o uso da LA como Quah-Smith e colaboradores (2013), que mencionam redução significativa de vômito pós-operatório em crianças com o tratamento da LA, no acuponto PC6, assim como a redução da hiperatividade brônquica em crianças com asma. E concluíram que o tratamento com LA, nos acupontos F14, F8, VC14, R3 e C7 reduz significativamente a depressão. Porém, não relatam por quais mecanismos esta resposta ocorre (QUAH-SMITH *et al.*, 2013).

2.4 ESTÔMAGO 36 (E36)

A acupuntura é uma importante técnica da medicina chinesa que trata várias doenças através da inserção de agulhas em regiões específicas do corpo chamadas de “acupontos” (ZHAO, 2008). De acordo com seus princípios básicos, a Medicina Tradicional Chinesa (MTC), após a estimulação do acuponto, renova o fluxo de energia (Qi) por meio de seus meridianos (LIM *et al.*, 2016). Na teoria dos Meridianos, referidos como canais (Jing), são reconhecidos 361 pontos de acupuntura (ZHAO, 2008).

O acuponto E36, chamado Zusanli, é um dos pontos de acupuntura mais importantes e amplamente utilizado na clínica para o tratamento de muitas doenças, como asma, hipertensão arterial, gastrite, entre outras (XIA *et al.*, 2014). Na Medicina Tradicional Chinesa, pertence ao meridiano do estômago e é representado pela letra E e o número 36. De acordo com a definição da Organização Mundial de Saúde, localiza-se na perna dos seres humanos conforme ilustrado na figura 6. O acuponto E36 foi selecionado para este trabalho, principalmente, devido à sua função anti-inflamatória e antinociceptiva descrita na literatura (KIM *et al.*, 2008; XIA *et al.*, 2014). Park e colaboradores (2013), em estudo com eletroacupuntura (EA) no acuponto E36, técnica que utiliza estimulação elétrica na agulha, relataram que a aplicação do estímulo

neste acuponto possui efeito terapêutico anti-inflamatório e anti-artrítico em artrite induzida por colágeno (CIA), por meio da ação dos receptores α_2 e β -adrenoceptores. Kim *et al.* (2008) mostraram que a estimulação com EA no acuponto E36 produz efeito inibitório significativo sobre a inflamação da pata induzida pela carragenina, mediados pelo eixo medular simpato-adrenal. Yim e colaboradores (2007) também relatam o efeito anti-inflamatório do acuponto por meio da redução significativa das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6 e INF- γ no modelo CIA (YIM *et al.*, 2007). Outro resultado importante sobre o acuponto E36 foi o apresentado por Baratto *et al.* (2011), que relatam seu efeito anti-inflamatório e anti-edematogênico, também, pela indução da carragenina na pata, mas com a estimulação com LASER no comprimento de onda correspondente ao vermelho.

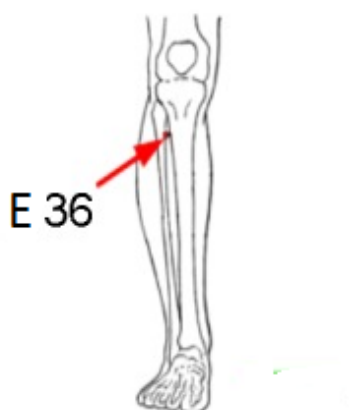


Figura 6: Localização do acuponto E36 (Zusanli) em humanos: quatro dedos abaixo da margem inferior da patela e um dedo lateral da crista anterior da tíbia (adaptada de YOU *et al.*, 2015).

Sendo assim, a partir do referencial teórico descrito neste capítulo, passa-se a descrever o desenvolvimento desta pesquisa, evidenciando os materiais e métodos utilizados para avaliar a ação da LA de baixa potência em modelos experimentais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Nos experimentos foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss (30 – 40 g) machos e fêmeas fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Paraná. Os camundongos permaneceram mantidos no biotério com ventilação e acondicionados no máximo 20 animais por caixa (37 X 33 X 17 cm), sob condições controladas de temperatura (22 ± 1 °C) e umidade (60 - 80%) em ciclos de 12 h claro-escuro (7:00 às 19:00 h). Os animais tiveram livre acesso à água e ração. Nos estudos comportamentais, os animais foram distribuídos homoganeamente entre os grupos e mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 h antes da realização dos experimentos. Estes foram conduzidos de acordo com as orientações e considerações éticas para investigação de dor experimental em animais (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais e a intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para obter os resultados. A experiência de trabalho com animais de laboratório tem mostrado que o número de 8 animais é estatisticamente suficiente para realizar um estudo de qualidade. De acordo com as diretrizes atuais para o cuidado de animais de laboratório e as diretrizes éticas para as investigações de dor experimental em animais conscientes, este é número recomendado. Os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR, protocolo 514).

3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística entre os grupos do experimento foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, com múltiplas comparações, ou análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias), seguida teste *post hoc* de Bonferroni, quando necessário. O valor de $p < 0,05$ foi considerado como indicativo de significância. Foi utilizado o software GraphPad Prism® versão 5.0 (San Diego, CA: 2008) para análise e representação gráfica dos resultados.

3.3 PROCEDIMENTOS DE TRATAMENTO COM LA

Para realização dos experimentos, utilizou-se o equipamento LASER AsGaAl, modelo LASERPULSE, fabricado pela IBRAMED, Brasil (figura. 7), ajustado com os seguintes parâmetros: comprimento de onda em 830 nm (em modo contínuo), densidade de energia em 4 J/cm², potência de 30 mW, área de irradiação em 6 mm² e a duração de 10 s, no ponto de acupuntura E36 (Tabela 1). A localização do acuponto E36 em camundongos foi efetuada de acordo com o estudo de Yin *et al.* (2008), que identifica a localização de vários pontos de acupuntura em roedores. A área do acuponto não foi depilada antes do tratamento. O acuponto E36 (Zusanli), está localizado entre a tíbia e a fíbula, aproximadamente 5 mm lateral ao tubérculo anterior da tíbia (figura 8) (YIN *et al.*, 2008).



Figura 7: Aparelho LASERPULSE, caneta LASER comprimento de onda 830 nm, fabricado pela IBRAMED.

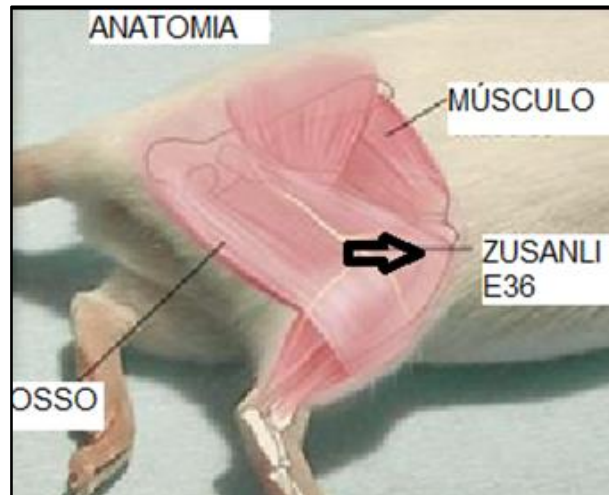


Figura 8: Localização do acuponto E36 (Zusanli) em camundongos.

Os animais foram randomizados nos seguintes principais grupos (n = 8): (1) grupo controle, que não foi tratado, mas sofreu intervenção pela indução de dor e inflamação; (2) Grupo LASER ON, o qual foi tratado com acupuntura LASER no acuponto E36 unilateralmente (figura 9); e (3) grupo LASER OFF, em que equipamento do LASER foi desligado, mas manteve-se a caneta em contato com o acuponto E36. Em alguns experimentos, acrescentou-se o grupo (4), dexametasona (DEXA, 0,5 mg/kg, ip), um controle positivo, e em outros, o grupo (5), Naive, que não sofreu intervenção alguma e também não foi tratado. Nos modelos de dor neuropática acrescentou-se o grupo Sham, o qual a aplicação do LASER foi realizado distante de algum ponto da acupuntura.

(A)



(B)



Figura 9: Aplicação da LA no acuponto E36. Em (A), ilustração da contenção do camundongo e área a ser aplicada o LASER e em (B), aplicação do LASER perpendicularmente ao acuponto E36.

Os experimentos foram realizados, primeiramente, em testes de inflamação e nocicepção aguda, e depois experimentos de nocicepção crônica. No final, foram verificados os mecanismos neurobiológicos endógenos que poderiam estar envolvidos no efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da LA no acuponto E36.

Tabela 1: Parâmetros aplicados da LA

Parâmetros	Informações e valores	Parâmetros	Valores
Modelo	Laserpulse (IBRAMED)	Abertura do diâmetro	0,16 cm
*Tipo de emissão	AsGaAl	Potência	30 mW
Comprimento de onda	830nm	Forma do feixe	Circular
Modo de operação	Contínuo (CW)	Tempo	10 s
Polarização	Linear	Largura da banda espectral	20 nm
Tamanho do pontoalvo	$\approx 2\text{mm}^2$ ($0,02\text{cm}^2$)	Radiação média	30 mW
Radiação de energia	40mJ	Densidade de energia	4 J/cm ²
Divergência do feixe	Divergente em $\approx 12^\circ$ paralelo ao feixe Divergente em $\approx 26^\circ$ perpendicular ao feixe	Área irradiada	6 mm ²
*Número de pontos irradiados	1	Total de energia irradiada	180 mJ
Técnica de aplicação	Contato com a pele		

3.4 CALIBRAÇÃO DO APARELHO LASER

A potência do aparelho LASER (IBRAMED) foi verificada por meio do medidor *Pocket Power- Handheld Power Meter*[®], produzido pela Melles Griot, ilustrado na figura 10.



Figura 10: Medidor de potência *Pocket Power* empregado no ensaio de calibração.

O teste foi realizado medindo-se a potência irradiada três vezes. Depois, calculou-se a média dessas medidas (29,1 mW) para minimizar erros de medida.

A calibração foi realizada irradiando-se o feixe do LASER perpendicularmente sobre o sensor do instrumento, que realiza a leitura após 2 s de exposição, mostrando o valor da potência. As medidas foram efetuadas após coberto o medidor de potência e o dispositivo LASER por um pano preto, para evitar alterações de valores geradas pela iluminação do local.

3.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE NOCICEPÇÃO AGUDO E CRONICO INFLAMAÇÃO AGUDA

3.5.1 Avaliação anti-inflamatória

3.5.1.1 Edema de pata induzida por carragenina

Os animais foram tratados durante 10 s com LASER ON e OFF ou DEXA (0,5 mg/kg, ip), um controle positivo. Após 30 min, foi injetado 20 µl de carragenina (300 µg/pata), administrada na pata traseira direita dos camundongos. A espessura do edema foi medida usando um micrômetro digital (Grande, MT-045B), antes da indução do edema (B: basal) e em diferentes tempos (30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4h e 5 h) após a injeção do agente flogístico (carragenina). Todas as avaliações foram realizadas pelo mesmo investigador, a fim de reduzir as diferenças de potencial entre investigadores.

3.5.1.1.1 Determinação dos níveis de LOOH, GSH e ROS após o edema de pata induzido pela carragenina

3.5.1.1.1.1 Preparação de frações subcelulares

Os tecidos retirados da pata traseira direita dos camundongos foram homogeneizados com solução tampão de fosfato de potássio 200 mM (pH 6,5) e utilizou-se homogenato para determinar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), hidroperóxido de lipídios (LOOH) e de glutathiona (GSH).

3.5.1.1.1.2 Determinação de proteínas no extravasamento plasmático

Os animais foram tratados intravenosamente com corante azul de Evans (25 mg/kg), um marcador do extravasamento de proteína no plasma, 4 h antes do tratamento do LASER e da DEXA. Após 30 min de tratamento, a carragenina foi injetada na pata traseira direita. A pele da pata traseira foi removida e pesada 2 h após a injeção de carragenina e extraiu-se o corante extravasado em formaldeído o qual permaneceu durante 24 h, à temperatura ambiente e foi medida posteriormente usando-se um espectrofotômetro (620 nm). O extravasamento da proteína no plasma foi determinado por interpolação numa curva padrão de corante azul de Evans (1,5-50 µg) e expressa em µg/g.

3.5.1.1.1.3 Determinação dos radicais livres intracelulares

A produção de espécies reativas de oxigênio intracelulares (ROS) foram quantificadas utilizando a sonda fluorescente 2', 7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA), como descrito por Brandte Keston (1965) e Driver e colaboradores (2000). O ensaio consiste na oxidação de DCFH-DA não-fluorescente para o composto altamente fluorescente 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF), na presença de ROS, incluindo o radical hidroxila, o peróxido de hidrogênio, e de peroxinitrito (KESTON e BRANDT, 1965; DRIVER *et al.*, 2000). Os homogenatos do tecido da pata do controle, e dos grupos de LASER ON e DEXA foram incubados com DCF a 37 °C no escuro. Em seguida, a intensidade de fluorescência foi detectada por um espectrofotômetro de luminescência (BioTek) comum, com comprimento de onda na faixa de 488 e 520 nm.

3.5.1.1.1.4 Determinação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)

Os níveis de LOOH foram determinados pelo método de oxidação-xilenol ferroso laranja (FOX2), como descrito por Jiang *et al.* (1992) . Resumidamente, 10 µL de metanol a 90% foi adicionado a 100 µL do homogenato. Logo após utilizou-se o ultrassom e a centrífuga a 9000 x g durante 20 min a 4°C para homogeneizar as amostras. O sobrenadante foi misturado ao reagente FOX2 e incubado durante 30 min em temperatura ambiente. A absorbância foi determinada em um espectrofotômetro leitor de microplacas no comprimento de

onda de 560 nm e os resultados foram expressos em mmol/mg de tecido (JIANG *et al.*, 1992).

3.5.1.1.1.5 Determinação dos níveis de glutathiona (GSH)

A determinação dos níveis de GSH na pata foi realizada pelo método de Lindsay e Sedlak (SEDLAK e LINDSAY, 1968). Alíquotas do tecido homogeneizado foram misturadas com ácido tricloroacético a 12,5%, agitados no vórtice durante 10 min e centrifugada durante 15 min a 9000 x g. Posteriormente, o sobrenadante foi misturado a solução tampão TRIS (0,4 M, pH 8,9) e 5,5' ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB, 0,01M). A absorbância foi medida por espectrofotometria a 415 nm (leitor de microplacas). Os procedimentos foram realizados a 4°C e os valores foram interpolados em uma curva padrão de GSH (0,375-3 µg) e foram expressos em µg/g de tecido.

3.5.1.1.2 Análise Termográfica

A análise termográfica foi realizada com uma câmera que capta a radiação infravermelha emitida por um corpo e a transforma em imagem, em tempo real. Representa a distribuição do calor na superfície do corpo (BALESTRA, 2011). Para que o exame termográfico possa ser adequado, alguns fatores precisam ser levados em conta: o ambiente deve ser termicamente controlado, a temperatura deve ser mantida em torno de 23 °C e a umidade relativa do ar também deve ser monitorizada e mantida em até aproximadamente 60%. O experimento foi realizado na superfície plantar da pata, 4 h após a aplicação da carragenina no modelo de pata. Para medição da temperatura empregou-se uma câmera infravermelha modelo A325, da FLIR Systems, Inc (USA) (Figura 10 A). Esta câmera opera em uma frequência de aquisição de 60 Hz, com resolução de 320 x 240 pixels, em 16 bits, e detecta radiação na faixa espectral de 7,5 a 13 µm. A lente incorpora foco monitorizado e autofocus, medição de temperatura na faixa de -20°C a +120°C, com erro de 2%, resolução térmica de 0,08 °C e espacial de 0,1 mm. O software para aquisição, armazenamento e análise das imagens termográficas é o ThermaCam Researcher Pro 2.9, da FLIR Systems, Inc (USA). Após a aquisição das imagens, foi selecionado uma área em círculo

para análise da temperatura média do local escolhido. Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com xilazina (5 mg/kg, i.p.) e cetamina (100 mg/Kg, i.p.) para suprimir os movimentos de fuga (Figura 11 B).

(A)



(B)

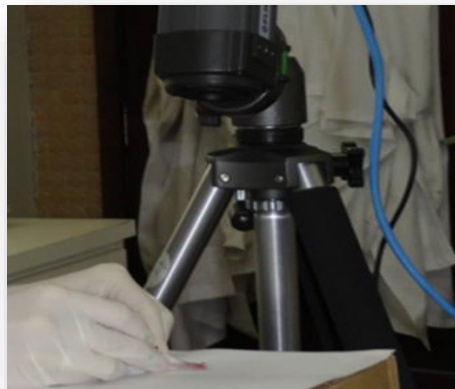


Figura 11: Análise termográfica. (A) Câmera para radiação infravermelha, modelo A325 da FLIR Systems, Inc (USA). (B) Captação de imagem da superfície plantar do camundongo anestesiado.

3.5.1.1.3 Edema de pata induzida por diferentes mediadores químicos

O efeito anti-inflamatório da LA no acuponto E36 foi testado através de agonistas inflamatórios induzidos por diferentes mediadores. O tratamento foi realizado durante 10 s com LASER ON e OFF, e depois de 30 min tratados, foi injetado intraplantarmente (i.pl.) a bradicinina (BK, 3 nmol/pata), a prostaglandina E2 (PG2, 3 nmol/pata) ou a histamina (HIS, 100 µg/pata) na pata traseira direita dos animais. A espessura da pata foi medida usando um micrômetro digital, inicialmente antes da indução do edema e depois 30 min, 1 h e 2 h após a injeção dos agentes flogísticos.

3.5.2 Avaliação antinociceptiva

3.5.2.1 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato

Para investigar o efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36 no sistema glutamatérgico, foi utilizado o modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Os animais foram tratados, 30 min antes da injeção

intraplantar com LA (LASER ON e OFF por 10 s) e posteriormente colocados individualmente dentro de funis de vidros transparentes para adaptação durante um período de 30 min. Ao fim deste período os camundongos receberam 20 μ l de solução de glutamato (20 μ mol/pata preparada em solução salina com pH ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio) na região intraplantar da pata posterior direita, conforme ilustrado na figura 12 A. Após a aplicação de glutamato foi cronometrado o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada durante 15 min (figura 12 B), tempo este que foi considerado como indicativo de nocicepção (BEIRITH *et al.*, 2002). Um grupo de animais não recebeu tratamento antes da administração do glutamato (grupo controle)

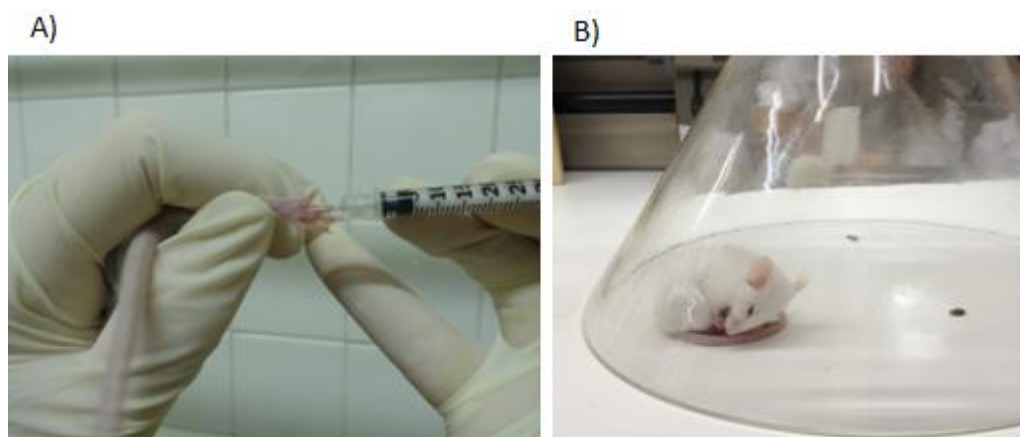


Figura 12: Modelo de nocicepção pela injeção de glutamato (A) Aplicação do glutamato na região intraplantar da pata posterior direita do camundongo. (B) Análise comportamental do camundongo após a aplicação do glutamato.

3.5.2.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina

Este modelo foi proposto em 1992, por Sakurada e colaboradores com o propósito de estudar a participação dos receptores TRPV1 (calor nocivo), em drogas com atividade antinociceptiva (SAKURADA *et al.*, 1992). Os animais foram tratados com LASER ON ou LASER OFF (no acuponto E36 por 10 s) ou vermelho de rutênio (antagonista TRP não seletivo, RR, 3 mg/kg, i.p.). Logo após o tratamento, os camundongos foram colocados individualmente dentro de funis de vidro transparente para adaptação durante um período de no mínimo 30 min. Em seguida, cada animal recebeu uma injeção de capsaicina (20 μ l, 1,6 μ g/pata) na pata posterior direita, sendo que o tempo que o animal permaneceu lambendo

e mordendo a pata injetada com capsaicina foi cronometrado durante 5 min. Este tempo foi considerado como indicativo de nocicepção.

3.5.2.3. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído

Este é um modelo que avalia a participação dos receptores TRPA1 (frio nocivo). O procedimento realizado neste modelo foi iniciado com os camundongos colocados individualmente dentro de funis de vidro transparente para adaptação durante um período de no mínimo 30 min. Os animais receberam tratamento por 10 s de LASER ON ou LASER OFF ou cânfora (antagonista não seletivo TRPA1, CAN, 7,6 mg/kg, s.c.), 30 min antes da injeção intraplantar de 20 µl da solução de cinamaldeído (10 nmol/pata) na pata posterior direita (ANDRADE *et al.*, 2008). Após a injeção foi cronometrado por um período de 5 min o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada.

3.5.2.4 Modelo de neuropatia induzida pela ligadura parcial do nervo ciático

Neste experimento, foi utilizado um modelo de dor crônica de origem neuropática chamado modelo de Lesão Parcial do Nervo Ciático ou Ligadura Parcial do Nervo Ciático (LPNC), para avaliar o efeito da LA realizado no acuponto E36 em dor crônica. Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com xilazina (5 mg/kg, i.p.) e cetamina (100 mg/kg, i.p.) e após tricotomia, efetuou-se uma incisão na região da coxa direita entre os músculos quadríceps e o isquiotibial. Os músculos da região foram divulsionados com uma pinça cirúrgica para exposição do nervo ciático (MALMBERG e BASBAUM, 1998). Após o procedimento descrito, aproximadamente um terço do nervo ciático foi amarrado (Figura 13) com um fio de sutura (Ethicon, Cardiovascular, 6.0 Prolone, não absorvível) já a epiderme foi suturada com fio 4.0 (Ethicon, Cardiovascular, Ethibond). Para uma melhor análise, acrescentou-se um grupo chamado de *sham* ou falso operado, onde os animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico; porém, o nervo foi exposto mas não foi ligado.



Figura 13: Localização anatômica da realização da cirurgia de ligadura parcial do nervo ciático (LPNC). Fonte: Adaptado de Decosterd e Berta (DECOSTERD, 2009).

Os animais permaneceram na mesa cirúrgica até a sua recuperação; posteriormente, foram recolocados em suas gaiolas e mantidos em temperaturas ideais de laboratório durante a realização do experimento. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado de acordo com o método descrito por Chaplan *et al.* (1994). Para tanto, os camundongos permaneceram em compartimentos individuais (9 x 7 x 11 cm) sobre uma plataforma de fundo gradeado, a fim de possibilitar o acesso dos filamentos à superfície ventral das patas traseiras dos animais. As avaliações iniciaram 7 dias após o procedimento cirúrgico, os animais foram avaliados antes do tratamento (basal) e 30 min depois do tratamento com LASER ON e OFF. O estímulo mecânico foi direcionado perpendicularmente à superfície plantar dos animais, ilustrado na figura 14 (BASBAUM, 2009). Foram analisadas as respostas (retirada ou não da pata) em relação à tensão aplicada por sete filamentos de von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, EUA) calibrados para produzir forças (0,02; 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0 gramas), que produzem diferentes graus de estimulação mecânica (inócua ou nociva). O método é chamado de "*up and down*" (CHAPLAN *et al.*, 1994).

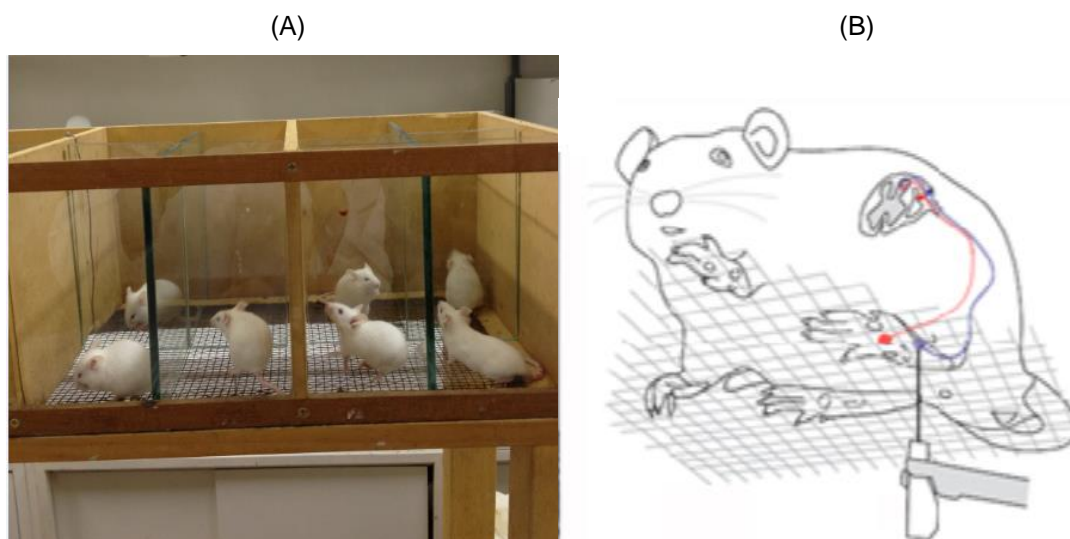


Figura 14: Avaliação da alodínia mecânica em (A) camundongos sob a plataforma de avaliação nos compartimentos individuais e em (B) aplicação do filamento de Von Frey na superfície ventral da pata do animal. Fonte: Figura B adaptado de Basbaum e Bushnell (2009).

3.5.2.5 Modelo de dor inflamatória crônica induzida pelo complexo adjuvante de Freund's

Os camundongos foram levemente anestesiados intraperitonealmente com xilazina (5 mg/kg, i.p.) e cetamina (100 mg/kg, i.p.) e foi injetado subcutaneamente 20 μ l de complexo adjuvante de Freund's (CFA) na região plantar da pata posterior direita para a indução da inflamação crônica. Após a indução, os animais foram avaliados diariamente, por 13 dias, em dois momentos um anterior ao tratamento e outro 30 min após 10 s de aplicação de LASER ON ou LASER OFF ambos realizados no acuponto E36. A alodínia mecânica foi avaliada com os filamentos de Von Frey conforme descrito na metodologia anterior (CHAPLAN *et al.*, 1994).

3.6 ANÁLISE DOS SISTEMAS

3.6.1 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo da LA realizada no acuponto E36

No intuito de avaliar algumas das possíveis vias endógenas pelas quais a LA no acuponto E36 exerce seu efeito antinociceptivo, foi investigado o envolvimento dos seguintes sistemas: colinérgico, adrenérgico e adenosinérgico.

Para esta avaliação, foram utilizadas ferramentas farmacológicas por meio do uso de agonistas e antagonistas seletivos dos receptores de cada um dos sistemas em estudo, sendo que esta etapa foi também avaliada no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar do glutamato. Os experimentos aconteceram nas seguintes etapas: (1) os camundongos foram pré-tratados com o antagonista ou veículo; e (2) após 20 min os animais foram tratados com LA no acuponto E36 (LASER ON por 10 s) ou com o agonista ou com veículo; (3) após 30 min os animais receberam glutamato (i.p.).

3.6.1.1 Participação no sistema colinérgico

Os camundongos foram pré-tratados com atropina (antagonista não seletivo de receptores muscarínicos, 1 mg/kg, i.p.), ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e, após 20 min, os animais foram tratados com LA (10 s), pilocarpina (agonista não seletivo de receptores muscarínicos, 3 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). A resposta nociceptiva ao glutamato foi avaliada 30 min após o tratamento com LA ou após a administração de pilocarpina ou veículo.

3.6.1.2 Participação no sistema adrenérgico

Os camundongos foram pré-tratados com prazosina (antagonista seletivo de receptores adrenérgicos α_1 , 0,1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.), e após 20 min, os animais foram tratados por 10 s com LA no acuponto E36, fenilefrina (agonista seletivo de receptores adrenérgicos α_1 , 10 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). A resposta nociceptiva ao glutamato foi avaliada 30 min após a aplicação de LA e a administração de fenilefrina ou veículo (i.p.), respectivamente. Outros grupos de camundongos foram pré-tratados com ioimbina (antagonista seletivo de receptores adrenérgicos α_2 , 0,1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e após 30 min os animais foram tratados com LA, clonidina (agonista seletivo de receptores adrenérgicos α_2 , 0,1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). A resposta nociceptiva ao glutamato foi avaliada 30 min após o tratamento de LA e a administração de clonidina ou veículo, respectivamente.

3.6.1.3 Participação no sistema adenosinérgico

Os camundongos foram pré-tratados com cafeína (antagonista não seletivo dos receptores adenosinérgicos, 3 mg/kg, i.p.) (MORE *et al.*, 2013) ou veículo (10 ml/kg, i.p.), e após 20 min, os animais foram tratados por 10 s com LA ou veículo (10 ml/kg, i.p.). Em todos os grupos de animais, a resposta nociceptiva ao glutamato foi avaliada 30 min após o tratamento com LASER ON.

4 RESULTADOS

Neste capítulo, descrevem-se os resultados provenientes da aplicação dos procedimentos descritos no Capítulo 3. Para um melhor entendimento, os resultados foram separados em três etapas: a primeira refere-se aos resultados do efeito antiinflamatório da LA no acuponto E36; a segunda aos resultados da ação antinocicpetiva e a terceira trata dos seus possíveis mecanismos de ação.

4.1 PRIMEIRA ETAPA: EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO

4.1.1 Efeitos da LA no acuponto E36 no edema de pata induzido pela carragenina

A carragenina foi capaz de induzir edema na pata dos camundongos 30 min após sua administração e esse efeito foi verificado até 5 h após a injeção do agente flogístico. Na figura 15, pode-se observar uma redução da indução do edema de pata induzido por carragenina nos animais do grupo LASER ON, com inibições de 13% em 2 h, 18% em 3 h e 12% em 4 h, em relação ao grupo controle. Portanto, o tratamento com LA foi capaz de prevenir a formação do edema que perdurou por até 4 h. A dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), um corticoide exógeno que apresenta efeitos anti-inflamatórios, também foi capaz de inibir a formação de edema de 0,5 até 4 h após a administração de carragenina na pata (Figura 14, grupo DEXA). Porém, o grupo LASER OFF, no acuponto, não foi capaz de reduzir a formação de edema (Figura 15).

4.1.1.1 Efeitos da LA no acuponto E36 no edema induzido pela carragenina na pata, após duas horas de tratamento

Conforme mostrado no gráfico da figura 15, a injeção de carragenina na pata dos camundongos resultou em um importante edema na pata. Na figura 16, observa-se redução do edema de pata induzido por carragenina nos animais do grupo LASER ON, 2 h após a injeção do agente flogístico, com a inibição de 13%. O tratamento com LA no acuponto E36 teve um efeito inibitório na formação do edema. A dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) também foi capaz de inibir a

formação de edema. Porém, o grupo LASER OFF no acuponto não foi capaz de reduzir a formação de edema quando comparado ao grupo controle (Figura 16).

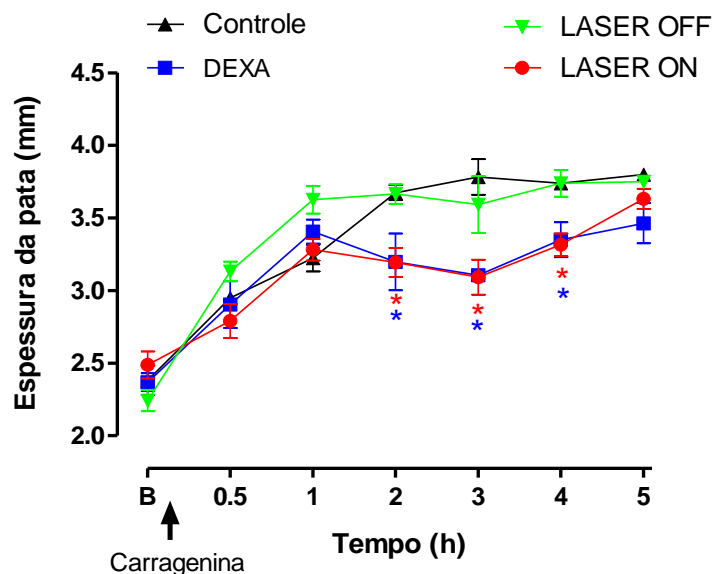


Figura 15. Efeitos da LA sobre o edema induzido por carragenina na pata de camundongos. B indica os valores basais, antes da aplicação da carragenina. A flexa preta indica a injeção carragenina i.p. (300 μ g/pata, 20 μ l). Os animais foram tratados com LASER ON, LASER OFF ou DEXA (0,5 mg/kg, i.p.) 30 min antes da injeção de carragenina. O grupo controle não recebeu tratamento prévio. Cada ponto representa a média de 8 animais \pm E.P.M. A análise foi realizada usando-se ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle.

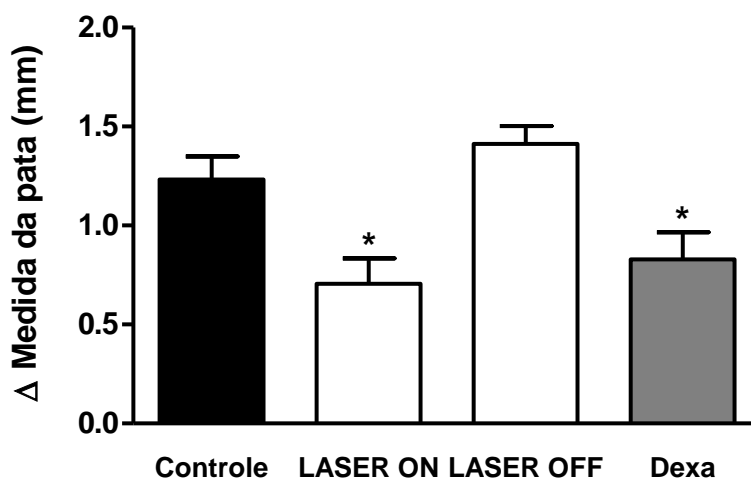


Figura 16. Efeitos do LASER ON sobre o edema de pata em camundongos, 2 h após a injeção de carragenina (300 μ g/pata, 20 μ l) no modelo de edema na pata. O grupo controle não recebeu tratamento prévio. Os animais foram tratados com LASER ON, LASER OFF ou DEXA (0,5 mg/kg, i.p.) 30 min antes da injeção de carragenina. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n= 8 animais). A análise foi realizada usando-se ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls, * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.1.1.2 Efeitos da LA no acuponto E36 sobre espécies reativas de oxigênio, lipoperóxidos e glutaciona reduzida induzidas pela injeção de carragenina na pata de camundongos

Os resultados apresentados na figura 17 A indicam que os animais do grupo controle mostraram um aumento da quantidade de extravasamento plasmático na pata após a aplicação da carragenina. O aumento da concentração do corante Azul de Evans foi de 77%, comparando o grupo controle com o Naive. O tratamento com LASER ON no acuponto E36 não reduziu o montante de Azul de Evans na pata induzido por carragenina. Porém, o tratamento com dexametasona (DEXA) reduziu 42% do montante de Azul de Evans quando comparado ao grupo controle.

Em relação às espécies reativas de oxigênio não ocorreu alteração significativa na atividade da GSH em nenhum dos grupos, conforme ilustrados na figura 16 B. Porém, houve uma diminuição significativa nos níveis de LOOH em 50% e 55% nas ROS ilustrados nos gráficos C e D da figura 17, respectivamente, quando tratados com LASER ON no acuponto E36, em relação ao grupo controle.

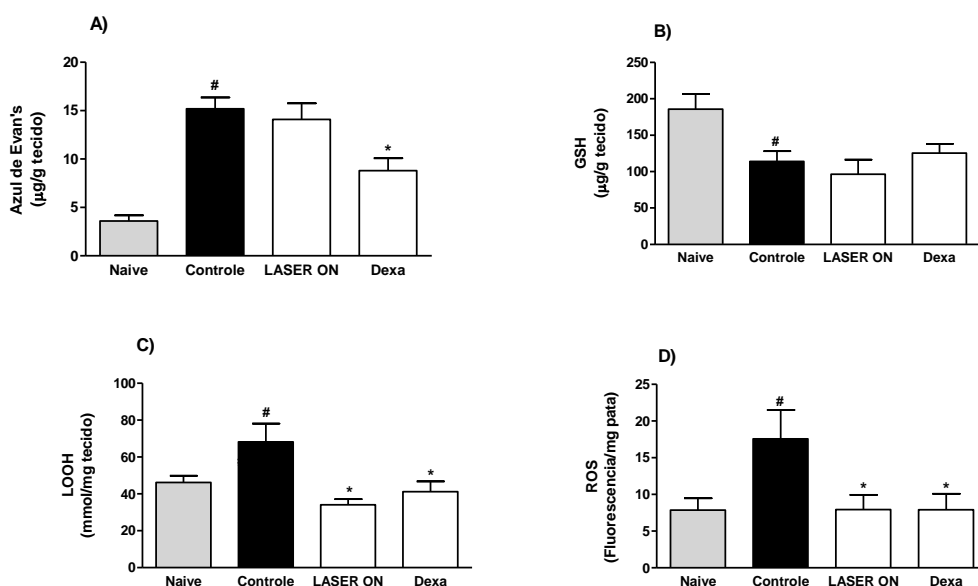


Figura 17. Efeitos da LA no extravasamento plasmático (gráfico A), GSH (gráfico B), LOOH (gráfico C) e ROS (gráfico D) no edema de pata induzido pela carragenina em camundongos. O grupo Naive não recebeu a aplicação da carragenina, nem tratamento. Os animais foram tratados com LASER ON ou DEXA (0,5 mg/kg, i.p.) 30 min antes da injeção da carragenina (300 µg/pata, 20 µl). Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias (n= 8 animais). A análise foi realizada usando-se ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls * p<0,05 quando comparado ao grupo controle e # p<0,05, quando comparado ao grupo naive.

4.1.1.3 Análise do efeito da LA no acuponto E36 no edema induzido pela carragenina por meio da termografia

As imagens e o gráfico representados na figura 18 ilustram a variação da temperatura da pele na superfície plantar da pata traseira direita dos camundongos. O grupo de animais Naive, que não foi injetado a carragenina apresentou a média na temperatura da pata de 26°C. Diferente dos animais que receberam a carragenina intraplantar que apresentaram um aumento na temperatura da pata na média de 31 °C. O Gráfico A mostra a variação das temperaturas nos grupos e a inibição da inflamação no grupo tratado com LA de 10%. Pode-se concluir que o tratamento do acuponto E36 com LA possui uma ação anti-inflamatória. A primeira imagem (B) representa a pata do animal no grupo controle e a segunda imagem (C) a pata do animal no grupo tratado com LASER ON no acuponto E36.

4.1.1.4 Efeitos da LA no acuponto E36 no edema de pata induzido por diferentes mediadores inflamatórios

Os resultados encontrados indicam que o tratamento com a LA foi capaz de inibir o edema de pata induzido pela BK em 6 e 7%, aos 30 min e 60 min, respectivamente, quando comparado ao grupo controle (Tabela 2). Entretanto, quando o edema de pata foi promovido pela HIST, o LA reduziu a formação do edema em 11% somente aos 30 min (C: 3,950 mm). Além disso, o LA também inibiu o edema induzido pela PGE2 em 10% aos 90 min, e em 16% aos 120 min, quando comparado ao grupo controle (C: 3,896 mm) (Tabela 2).

Tabela 2: Efeito da LA no acuponto E36 no edema induzido por agentes flogísticos na pata do camundongo

Agente Flogístico	Tempo após a aplicação do agente flogístico (min)	Inibição do edema %
HIST	30	11 ***
PGE2	90, 120	10 *, 16 ***
BK	30, 60	6 *, 7 **

HIST: histamina; PGE2: prostaglandina 2; BK: bradicinina

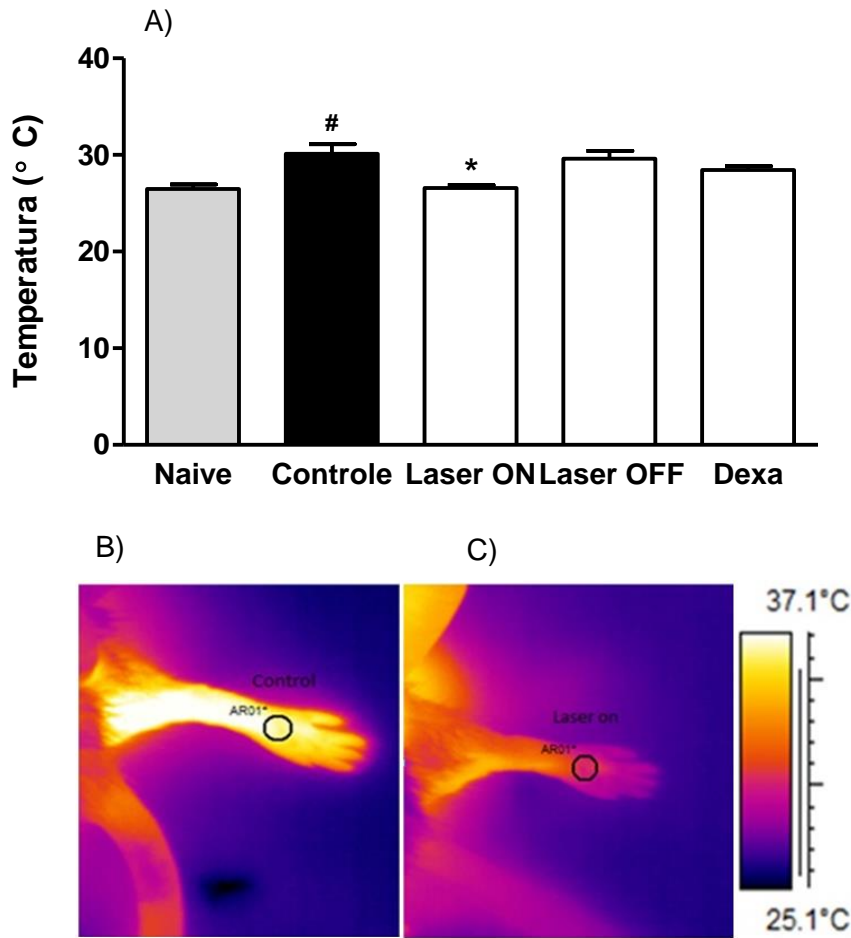


Figura 18. Gráfico e imagens digitalizadas de medições da temperatura da superfície da pele plantar da pata traseira dos camundongos. (A) Gráfico: Efeito antiinflamatório do acuponto E36 na LA no modelo de edema da pata induzido por carragenina em camundongos. As imagens B e C foram obtidas usando uma câmara de vídeo de infravermelho. Na imagem (B), termograma de pata do grupo controle e em (C), do grupo LASER ON. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 8$ animais). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls. O asterísco denota os níveis de significância, quando comparados com o grupo controle, * $p < 0,05$. e # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo naive.

4.2 SEGUNTA ETAPA: EFEITO ANTINOCICEPTIVO

4.2.1 Efeitos da LA no acuponto E36 no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato

O glutamato ($20 \mu\text{mol/pata}$) induziu a nocicepção nos animais, observado pela resposta nociceptiva de morder e/ou lamber a pata injetada, comportamento observado principalmente no grupo controle (figura 19). O tratamento com LASER ON no acuponto E36, inibiu significativamente a nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos, com valores de inibição de 44%. O tratamento

com LASER OFF não foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pela injeção de glutamato, quando comparado com o grupo de controle.

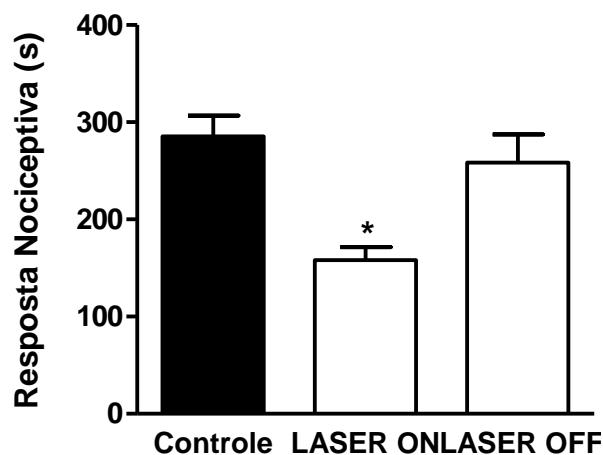


Figura 19: Efeito antinociceptivo do LASER ON no acuponto E36 no modelo de nocicepção induzida por glutamato em camundongos. Os animais foram pré-tratados com Laser ON ou Laser OFF 30 minutos antes da aplicação do glutamato (20 $\mu\text{mol/pata}$). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 8$ animais). A comparação entre os grupos foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls. O asterísco denota os níveis de significância, quando comparados com o grupo controle, * $p < 0,05$.

4.2.2 Efeitos da LA no acuponto E36 no modelo de nocicepção induzido pela capsaicina na pata

No grupo LASER ON, a aplicação no acuponto E36 reduziu a nocicepção induzida por capsaicina (1,6 $\mu\text{g/pata}$) com inibição de 53% (Figura 20). O vermelho de rutênio (RR, 3 mg/kg, i.p), controle positivo do teste, inibiu a resposta nociceptiva causada pela capsaicina em 56%.

4.2.3 Efeito da LA no acuponto E36 no modelo de nocicepção induzido pela cinamaldeído na pata

A aplicação do LASER no acuponto E36 reduziu a nocicepção induzida por cinamaldeído (1,32 $\mu\text{g/pata}$) com inibição de 80% em relação ao grupo controle (Figura 21). O controle positivo, cânfora (7,6 mg/kg, s.c.), inibiu a resposta nociceptiva em 43%, também em relação ao grupo controle.

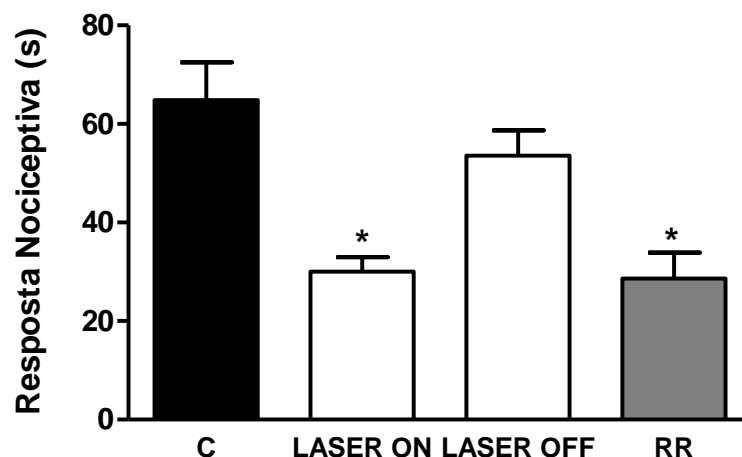


Figura 20: Efeito antinociceptivo do LASER ON no acuponto E36 no modelo de nocicepção induzida por capsaicina. O gráfico representa o efeito antinociceptivo do LASER ON, LASER OFF e do vermelho de rutênio (3 mg/kg, i.p.), controle positivo no modelo de nocicepção induzido por capsaicina (1,6 μ g/pata). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n = 8 animais). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls. O asterísco denota os níveis de significância, quando comparados com o grupo controle, * p<0,05.

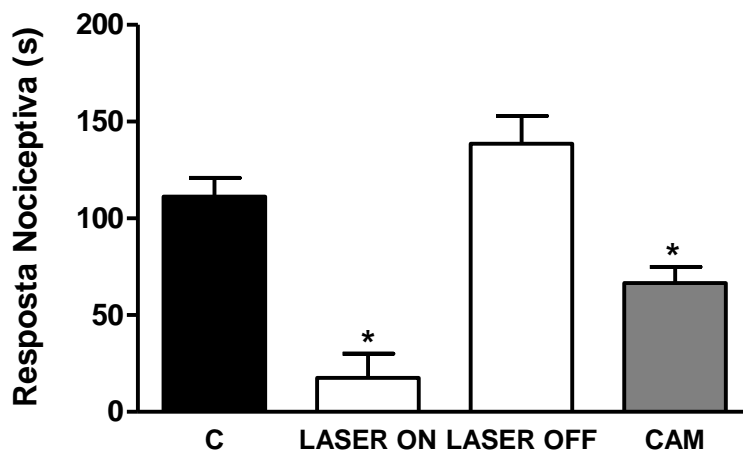


Figura 21: Efeito antinociceptivo do LASER ON no acuponto E36 no modelo de nocicepção induzida por cinamaldeído (1,32 μ g/pata). O gráfico representa o efeito antinociceptivo da LA no grupo LASER ON e da cânfora (7,6 mg/kg, s.c.), controle positivo no modelo. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n = 8 animais). A comparação entre os grupos foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls. O asterísco denota os níveis de significância, quando comparados com o grupo controle, * p<0,05.

4.2.4 Efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36 no modelo de ligadura parcial do ciático

Nesta etapa, foi avaliado o efeito LA no acuponto E36 sobre o modelo de nocicepção crônica induzido pela ligadura parcial do ciático. A LPNC causou uma importante alodínia mecânica sete dias após a cirurgia, todos os animais operados apresentaram diminuição do limiar nociceptivo mecânico (grupo controle), ou seja, apresentaram hipersensibilidade frente aos estímulos com os filamentos de von Frey. Os resultados apresentados na figura 22 mostram que o tratamento da LA no acuponto E36 reduziu significativamente a alodínia mecânica nos animais operados (grupo LASER ON) (Figura 22). O efeito antinociceptivo do grupo LASER ON, conforme resultados obtidos anteriormente em laboratório permaneceram de forma significativa até 2 h depois do tratamento, com inibição de 47% após 30 min do tratamento (*time course*).

O efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36 foi avaliado ao longo de 10 dias. O tratamento foi realizado diariamente e os animais avaliados 30 min após tratamento. O grupo LASER ON apresentou redução da alodínia mecânica ao longo dos primeiros oito dias com inibição máxima de 45% no quarto dia. Porém, a partir do 9º dia não se observou mais redução significativa da alodínia mecânica ao tratamento com LA. O grupo LASER OFF não apresentou nenhum efeito antinociceptivo.

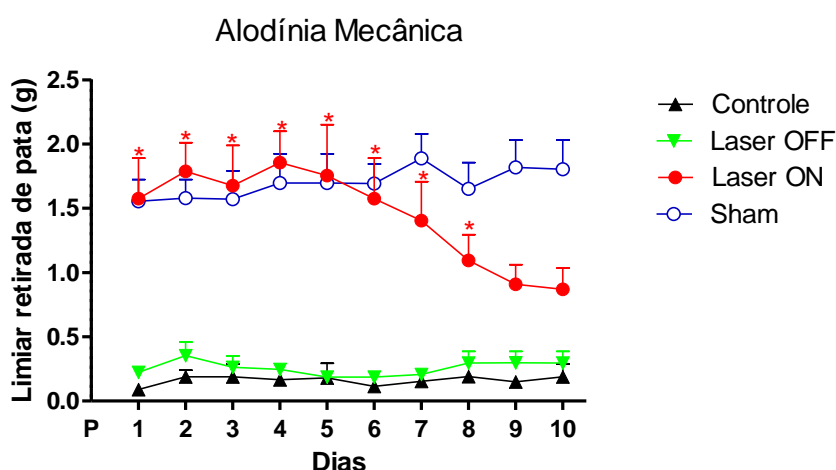


Figura 22. Efeito da LA no acuponto E36 sobre a alodínia mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos. O tratamento com LA foi realizado por 10 dias, antinocicepção foi avaliada 30 min após o tratamento (B: freqüência de resposta basal). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 8$ animais). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA de duas vias) seguida do teste de Bonferroni, diferente do grupo operado para * $p < 0,05$.

4.2.5 Efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36 no modelo CFA

A aplicação de CFA na pata traseira dos animais apresentou uma diminuição significativa no limiar nociceptivo mecânico, decorrente de uma indução inflamatória, observado no grupo controle. O tratamento de LA no acuponto E36, no modelo CFA, reduziu significativamente a dor crônica avaliada por meio dos filamentos de von Frey na pata animais. Tratados diariamente (uma vez ao dia) durante um período de 13 dias, a avaliação realizada na aplicação diária da alodinia mecânica reduziu a inibição variando em 95 e 84 % até o 8º dia. No entanto, a partir do dia 9º, não houve resposta significativa (Figura 23).

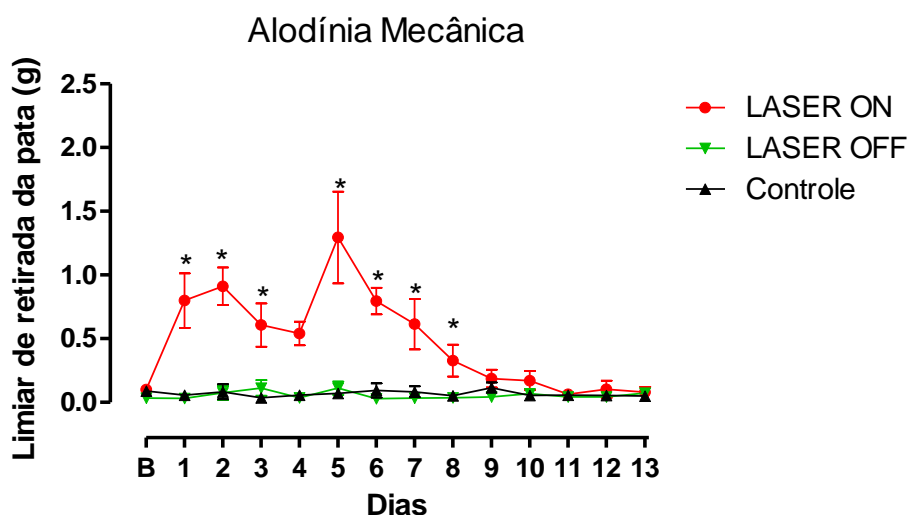


Figura 23: Efeito da LA no acuponto E36 sobre a alodínia mecânica induzida pelo CFA em camundongos. O tratamento com LA foi realizado por 10 dias, antinocicepção foi avaliada 30 min após o tratamento (B: frequência de resposta basal). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 8$ animais). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise da variância (ANOVA de duas vias) seguida do teste de Bonferroni, diferente do grupo operado para $*p < 0,05$.

4.3 TERCEIRA ETAPA: ANÁLISE DOS SISTEMAS

4.3.1 Participação do sistema colinérgico no efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36

Os resultados apresentados na figura 24 mostram que o antagonista colinérgico muscarínico, atropina (1 mg/kg), quando administrado antes da injeção de glutamato, alterou significativamente o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo as patas quando comparado aos animais

do grupo controle. Observou-se, também, que o agonista administrado previamente ao glutamato, pilocarpina (agonista muscarínico) reduziu a ação nociceptiva do glutamato quando comparado ao grupo controle. Os dados obtidos revelam que o tratamento com os antagonistas de receptores muscarínicos preveniram o efeito antinociceptivo da LA realizada no acuponto E36.

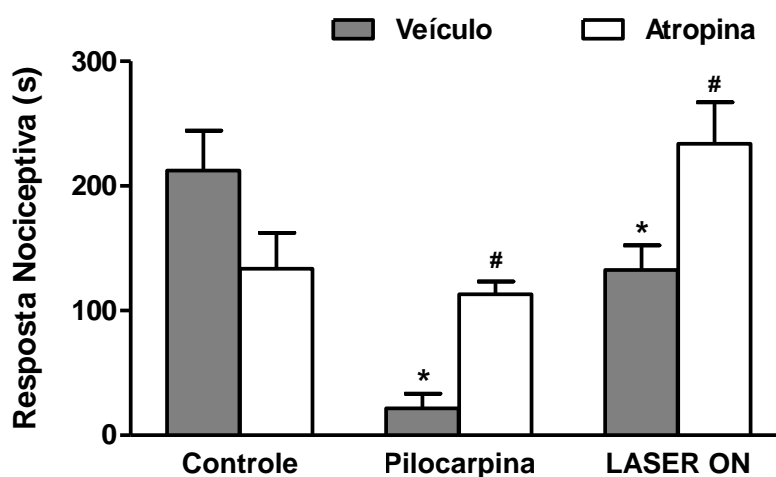


Figura 24: Efeito do pré-tratamento com atropina (0,15 mg/kg, ip, de um antagonista não seletivo de receptores muscarínicos), no efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36 e da pilocarpina (10 mg/kg, ip, agonista não seletivo de receptores muscarínicos), no modelo de nocicepção induzido pelo glutamato. Cada grupo representa a média de 8 animais, e as linhas verticais indicam o E.P.M., * p < 0,05 quando comparado ao grupo controle; # p < 0,05 quando se compara antagonista vs agonista ou tratamento a LASER (ANOVA de uma via seguido por Newman-Keuls Teste de Comparação Múltipla).

4.3.2 Participação do sistema Adrenérgico dos receptores α_1 no efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36

Examinando os resultados na figura 25, pode-se observar que o antagonista adrenérgico prazosina (antagonista seletivo de receptores adrenérgicos α_1) não modificou o número de lambidas e mordidas dos animais submetidos à injeção de glutamato. Porém, foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da fenilefrina (agonista seletivo de receptores adrenérgicos α_1) e da LA no acuponto E36.

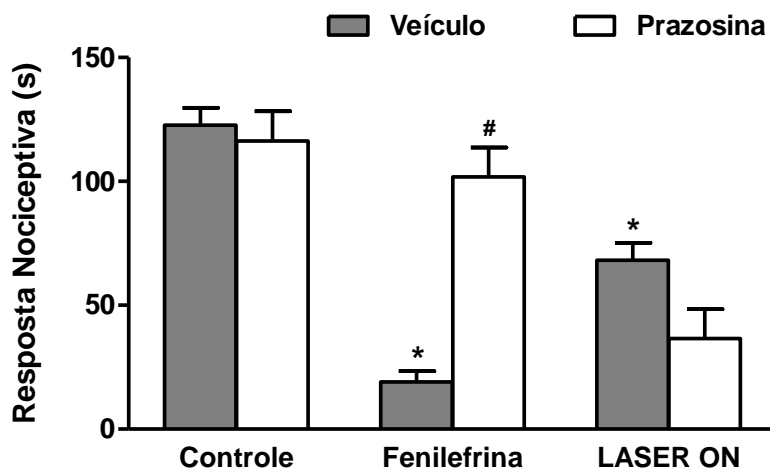


Figura 25: Efeito do pré-tratamento com prazosina (0,15 mg/kg, ip, de um antagonista seletivo α_1 -adrenérgico), no efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36 e da fenilefrina (10 mg/kg, ip, agonista seletivo do receptor α_1 -adrenérgico), no modelo de nociceção induzido pelo glutamato. Cada grupo representa a média de 8 animais, e as linhas verticais indicam o E.P.M.* $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ quando comparado antagonista vs. agonista ou tratamento a LASER (ANOVA de uma via seguido por Newman-Keuls Teste de Comparação Múltipla).

4.3.3 Participação do sistema Adrenérgico dos receptores α_2 no efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36

Na figura 26, constata-se que o antagonista adrenérgico ioimbina (antagonista seletivo de receptores adrenérgicos α_2) não modificou o número de lambidas e mordidas dos animais submetidos à injeção de glutamato. Porém, foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo da clonidina (agonista seletivo de receptores adrenérgicos α_2) e do tratamento da LA no acuponto E36.

4.3.4 Participação no sistema Adenosinérgico no efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36

Nos resultados ilustrados na Figura 27, verifica-se que o antagonista dos receptores adenosinérgicos, cafeína (3 mg/kg, i.p.), não interfere no número de mordidas e lambidas induzidas pelo glutamato, quando administrada intraperitoneal, antes da injeção de glutamato. Este resultado mostra que o antagonista utilizado foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36

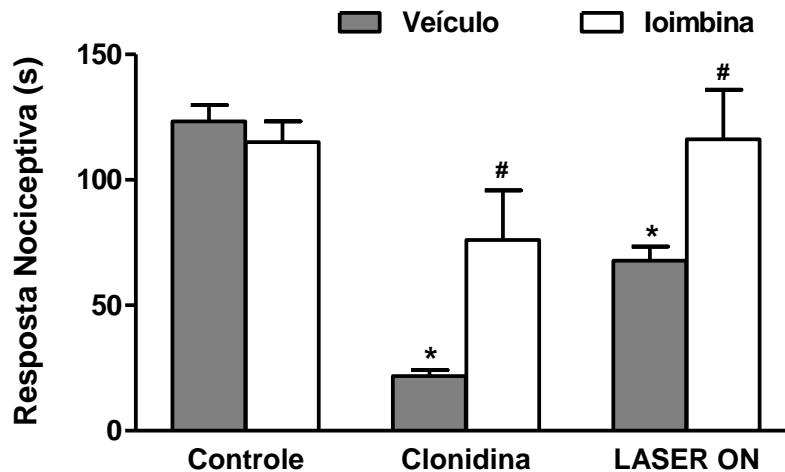


Figura 26: Efeito do pré-tratamento com ioimbina (0,15 mg/kg, ip, de um antagonista seletivo α_2 -adrenérgico), no efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36, e da clonidina (0,1mg/kg, ip, agonista seletivo do receptor α_2 -adrenérgico), no modelo de nociceção induzido pelo glutamato. Cada grupo representa a média de 8 animais, e as linhas verticais indicam o E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ quando comparado antagonista vs. agonista ou tratamento a LASER (ANOVA de uma via seguido por Newman-Keuls Teste de Comparação Múltipla).

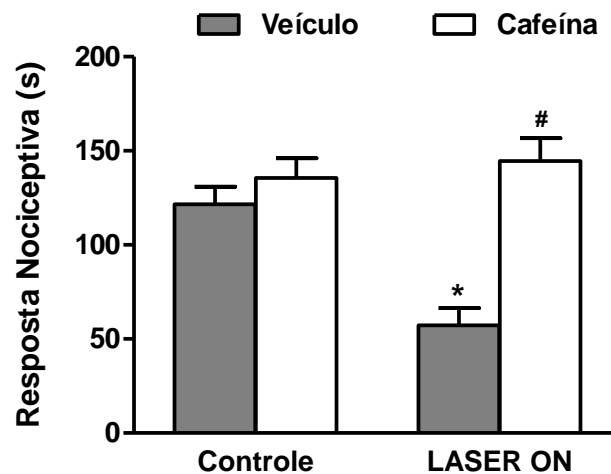


Figura 27. Efeito da cafeína (3 mg/kg, i.p.) de pré-tratamento sobre o efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36 no modelo de nociceção induzido pelo glutamato. Cada grupo representa a média de 6-8 animais, e as linhas verticais indicam o E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ quando comparados tratamento vs. cafeína (*one-way* ANOVA seguido pelo Teste de Comparação Múltipla de Newman-Keuls).

5 DISCUSSÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2014, as dores, em geral, atingiram 30% da população mundial e, de acordo com a Sociedade Brasileira de Estudos da Dor, o percentual de pessoas acometidas com esse sintoma no Brasil é de 15 a 40%. Atualmente, para o tratamento ou melhora da dor, drogas como os anti-inflamatórios não-esteroidais ou opióides, são utilizadas, podendo ocasionar efeitos colaterais sérios, principalmente efeitos gastrointestinais, dependência física e intolerância (TAKANO *et al.*, 2012). Por essa razão, enfatiza-se a busca de novos tratamentos alternativos que permitam a cura da dor.

A terapia LASER de baixa intensidade é uma técnica da área de saúde que utiliza o estímulo fotônico para tratar lesões em tecidos, aliviar dor, reduzir inflamação, edema e estimular acupontos, sem existir efeitos adversos (JANG e LEE, 2012; FABRE *et al.*, 2015). Sabe-se que a terapia LASER altera as funções das células e dos tecidos para conseguir benefícios terapêuticos, por meio de uma ação fotoquímica, fotoenergética e fotobiológica, sem produzir efeito térmico. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos e os mecanismos de ação do LASER de baixa potência em acupontos (QUAH-SMITH *et al.*, 2013; FABRE *et al.*, 2015).

Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a atividade antinociceptiva aguda e crônica e anti-inflamatória aguda da LA no acuponto E36, em modelos de nocicepção e inflamação aguda e crônica, induzidos por agentes químicos e em modelo de neuropatia periférica em camundongos. Além disso, foram investigados alguns possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da LA, propiciando, assim, uma base científica importante para essa terapia. O presente estudo mostra evidências que suportam o uso de LA no acuponto E36 para o tratamento de dor e inflamação, bem como contribui sobre os mecanismos endógenos envolvidos.

O acuponto E36 foi selecionado neste trabalho principalmente devido à sua função anti-inflamatória e antinociceptiva descrita na literatura (KIM *et al.*, 2008; XIA *et al.*, 2014). Park *et al.* (2013), em estudo com eletroacupuntura (EA) no acuponto E36, técnica que utiliza estimulação elétrica na agulha, relataram que a aplicação do estímulo neste acuponto possui um efeito terapêutico anti-

inflamatório e anti-artrítico em artrite induzida por colágeno (CIA), através da ação dos receptores α_2 e β -adrenoceptores. Kim *et al.* (2008) mostraram que a estimulação com EA no acuponto E36 produz efeito inibitório significativo sobre a inflamação da pata induzida pela carragenina, mediados pelo eixo medular simpato-adrenal. Yim *et al.* (2007) também relataram o efeito anti-inflamatório do acuponto por meio da redução significativa das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6 e INF- γ no modelo CIA. Outro resultado importante sobre o acuponto E36 foi o apresentado por Baratto *et al.* (2011), que relatam seu efeito anti-inflamatório e anti-edematogênico, também pela indução da carragenina na pata, mas com a estimulação LASER de luz vermelha. Os dados encontrados nesta pesquisa mostram que o estímulo fotônico no acuponto E36, com LASER AsGaAl no comprimento de onda de 830 nm (infravermelho), reverte significativamente a nocicepção e a inflamação em modelos agudos e crônicos.

5.1 Atividade anti-inflamatória da LASER acupuntura no acuponto E36 nos modelos de nocicepção inflamatória aguda e de edema de pata

A fim de entender sobre os efeitos da LA, foram utilizados modelos de inflamação aguda em animais. A inflamação é uma resposta imediata do corpo ao dano tecidual e envolve a participação de diversos sistemas, mediadores e células especializadas. Atualmente, o LASER de baixa potência é utilizado na acupuntura como uma técnica não medicamentosa para o controle da dor e da inflamação, evitando o uso de analgésicos e anti-inflamatórios (AVCI *et al.*, 2013). Porém, revisões sistemáticas sobre a utilização da LA no acuponto E36 utilizando AsGaAl, no tratamento da inflamação, não chegam a indicar resultados elucidativos, devido à insuficiência dos dados ou à presença de achados conflitantes, assim como a ausência de seu mecanismo de ação. Trabalhos recentes, como de Jesus e colaboradores (2014), afirmam que o mecanismo anti-inflamatório da LA não está totalmente esclarecido (DE JESUS *et al.*, 2014). Há evidências sugerindo que a terapia LASER produz efeitos anti-inflamatórios significativos por meio da síntese, liberação e metabolismo de vários mediadores químicos, tais como alteração na produção de histamina e prostaglandinas periféricamente e de serotonina e acetilcolina centralmente (FABRE *et al.*, 2015). Entretanto, observa-se que a eficácia da terapia depende

da escolha correta de parâmetros como o comprimento de onda, tempo, potência e dose, utilizados no tratamento.

Esta primeira fase dos experimentos teve como objetivo avaliar alguns dos sinais clássicos que caracterizam o processo inflamatório: edema (exsudação de fluido e aumento da permeabilidade), calor (aumento do metabolismo celular) e dor (BOSCHI *et al.*, 2008; CASTARDO *et al.*, 2008). Durante a fase inflamatória, ocorre ação fagocitária das células, acontecendo secundariamente um aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), gerando estresse oxidativo (CASTARDO *et al.*, 2008; LUO *et al.*, 2013). As ROS contribuem para promover o dano tecidual e prejudicar o processo de cicatrização, surgindo de danos celulares por peroxidação de lipídeos na membrana, inativação de enzimas e destruição do DNA (SILVEIRA *et al.*, 2011).

Entre os modelos experimentais, a carragenina injetada na pata de animais é um modelo experimental de inflamação aguda que vem sendo utilizado em estudos para análise de efeitos anti-inflamatórios, sendo cada vez mais usado para testar novas drogas e terapias (CASTARDO *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2011). A aplicação da carragenina na pata dos camundongos induz o edema, o qual é normalmente correlacionado com a formação do exsudato, à migração dos fagócitos, à liberação dos mediadores químicos e aumento dos radicais livres, presentes no processo inflamatório (CASTARDO *et al.*, 2008). Os resultados obtidos nesta tese indicam que o tratamento com LA no acuponto E36 reduziu significativamente a inflamação e a formação do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos. Esses dados corroboram com pesquisas anteriores em outros acupontos (BP6, VG1, VG 20 e Yintang) utilizando a técnica manual, em modelos inflamatórios agudos, que também resultaram em importantes efeitos anti-inflamatórios (SCOGNAMILLO-SZABO *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2011).

Sabe-se que a terapia por meio de LASER ativa tanto a microcirculação local como aumenta o metabolismo celular, produzindo efeitos anti-inflamatório, antiedematoso, analgésico e regenerativo (AVCI *et al.*, 2013). Lee *et al.* (2006) relataram a eficácia do tratamento com eletroacupuntura nos acupontos E36 e BP6 com diferentes frequências (2, 15 e 120 Hz), no modelo de edema de pata, por carragenina, em ratos. Seus resultados mostraram efeitos

antiedematogênicos com todas as frequências, principalmente com a frequência de 2 Hz, como o efeito obtido no presente estudo.

Na terapia com LASER, são utilizados diferentes comprimentos de onda, que variam entre 633,8 e 904 nm (ARTES-RIBAS *et al.*, 2013). Segundo Avic *et al.* (2013), os comprimentos de onda entre 390-600 nm são usados para tratar tecidos superficiais, pois penetram somente a camada da epiderme e, entre 600 a 1100 nm para tratar tecidos profundos devido a sua penetração em todas as camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme. Neste contexto, o LASER, no espectro do comprimento de onda entre 620 e 830 nm tem o potencial para estimular fotorreceptores localizados nas membranas plasmáticas das células (FABRE *et al.*, 2015). Markovic e Todorovic (2007) relataram que a aplicação local do LASER AsGaAl (modo contínuo) reduziu em 20-30% o edema em ratos no modelo de inflamação aguda induzida pela carragenina. O tratamento com LA, no comprimento de onda de 830 nm, empregado neste estudo, que atinge as camadas superficiais e profundas da pele, mostrou significativa efetividade nos modelos de nocicepção e inflamação. O tipo de LASER utilizado neste estudo foi selecionado com base em uma avaliação cuidadosa da literatura, através de qual se determinou que o LASER AsGaAl no comprimento de onda de 830 nm possui uma importante capacidade analgésica e anti-inflamatória (MARKOVIC e TODOROVIC, 2007; ARTES-RIBAS *et al.*, 2013).

Outro parâmetro importante no tratamento utilizando estímulo fotônico é a densidade de energia irradiada. É sabido que doses baixas usadas na terapia LASER podem reduzir a dor, a inflamação (BJORDAL *et al.*, 2006) e o edema (CARATI *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2009). A densidade de energia utilizada neste estudo, 4 J/cm², foi escolhida com base no parecer e nas recomendações de vários estudos utilizando a LA, e recentemente, o Australian Medical Acupuncture College declarou que a dose de 4 J/cm² é ideal para obter o efeito de bioestimulação (LITSCHER e OPITZ, 2012; LOPEZ-RAMIREZ *et al.*, 2012). De acordo com a lei de Arndt-Schultz, a ação da bioestimulação na produção de efeitos anti-inflamatórios e analgésicos deve ocorrer em doses entre 0,5 e 10 J/cm² (YU *et al.*, 1997). Porém, López-Ramirez e colaboradores (2012) sugerem em seu estudo utilizando LASER de AsGaAl (810 nm) na densidade de energia 4 J/cm² em aplicação intra-oral pós-cirúrgico de extração dentária, que não houve redução significativa da dor e do edema facial (LOPEZ-RAMIREZ *et al.*,

2012). Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo onde a dose de 4 J/cm² produziu efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório. É importante ressaltar que pesquisas em modelos animais e estudos clínicos têm demonstrado que o tratamento utilizando LASER produz efeitos altamente benéficos sobre uma variedade de doenças e ferimentos, nas condições crônicas e agudas, com a dose de 4 J/cm² (HUANG *et al.*, 2009). Bjordal *et al.* (2006) recomendam que, para obter um efeito anti-inflamatório, deve-se utilizar o LASER com o comprimento de onda entre 810-830 nm, em doses abaixo de 6 J. Em estudos experimentais empregando modelos de inflamação e nocicepção previamente realizados pela autora, a dose aplicada produziu a melhor resposta à dor e a inflamação (ERTHAL *et al.*, 2013). Vale ressaltar que nos resultados aqui obtidos, nos gráficos ilustrados nas figuras 14 e 15, a LA foi tão eficaz quanto a dexametasona, um anti-inflamatório esteroidal. Com exceção, os resultados demonstrados no gráfico 16 A, que a dexametasona inibiu o extravasamento plasmático, diferentemente do resultado no grupo LASER ON que não apresentou nenhuma alteração. A dexametasona é um esteróide muito utilizado para tratar problemas inflamatórios e alérgicos, indicado por médicos e dentistas. Este corticóide inibe a resposta da inflamação aguda. Seu efeito tem sido atribuído pela inibição dos mediadores químicos e da COX-2 (LIMA *et al.*, 2012). Nesta pesquisa utilizou-se a dexametasona baseando-se, principalmente, no estudo de Markovic e Todorovic (2007), que realizaram aplicações de LASER (4 J/cm²) e LASER (4 J/cm²) combinado com a dexametasona (4 mg, uso oral) após cirurgia do terceiro molar e demonstraram estatisticamente que ambos os grupos, LASER e dexametasona, tiveram um efeito anti-inflamatório, porém quando combinados, a dexametasona não exerceu um melhor efeito anti-edematoso que somente a aplicação do LASER. Por esse motivo, concluem que não se justifica a utilização do anti-inflamatório esteroidal quando aplicado o LASER (MARKOVIC e TODOROVIC, 2007).

Também não existem dados que demonstrem e elucidem o mecanismo de ação pelo qual o estímulo fotônico AsGaAl exerce seu efeito, principalmente na ação edematogênica (CARROLL *et al.*, 2014). Uma das explicações do mecanismo no efeito produzido pelo LASER é a absorção da luz na faixa do espectro do infravermelho e vermelho por cromóforos, principalmente o citocromo c oxidase, que está presente na cadeia respiratória mitocondrial.

Segundo Artes-Ribas *et al.* (2013), o principal efeito do LASER é a alteração dos níveis de ATP, reações redox e troca de oxigênio (AVCI *et al.*, 2013). O citocromo c transforma ADP em ATP, e a absorção do feixe luminoso resulta em um aumento na síntese de ATP, assim como na alteração na concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que se formam durante o processo de redução do oxigênio, como os hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (SILVEIRA, 2009). Porém, o organismo possui substâncias envolvidas na regulação desse processo com a função antioxidante e uma delas é a glutathiona reduzida (GSH) (SILVEIRA, 2009). Os dados obtidos nesta pesquisa sugerem que o mecanismo antiedematogênico da LA no acupunto E36 não é resultante da diminuição do extravasamento plasmático e nem por um aumento dos níveis de GSH. Porém, está descrito na literatura, como na revisão sistemática de Lins e colaboradores (2010) que o efeito edematogênico do LASER ocorre pelo aumento da circulação, resultando em alteração na pressão hidrostática capilar, com reabsorção do edema; assim como Markovic (2007) relata que o efeito antiedematoso é baseado diretamente no efeito da diminuição da permeabilidade dos vasos sanguíneos, diminuindo o extravasamento plasmático: dados que não foram encontrados neste estudo. Segundo Silveira e colaboradores (2009), dependendo da dose, do tempo e da intensidade, é possível a terapia LASER alterar a produção excessiva de ROS. Em seus experimentos de cicatrização, obtiveram diminuição significativa da lipoperoxidação em grupos tratados com LASER nas doses de 2 J/cm² e 4 J/cm², corroborando com os resultados aqui apresentados; assim como Carrol e colaboradores (CARROLL *et al.*, 2014) em uma revisão sistemática, afirmam que os efeitos secundários da terapia LASER ocorrem pela absorção da luz pelo citocromo c oxidase, aumentando a síntese de ATP e reduzindo o estresse oxidativo, dependendo da dose utilizada. O ATP é um combustível universal para todas as células vivas impulsionando as reações biológicas e pequenas alterações na sua produção podem modificar significativamente o metabolismo celular (SILVEIRA *et al.*, 2011; CARROLL *et al.*, 2014). Segundo Silveira e colaboradores (2011), o LASER acelera o processo inflamatório agudo pelo fato que a maioria das células inflamatórias utilizam ATP, diminuindo assim, o tempo de exposição dos efeitos nocivos do processo inflamatório, como das espécies reativas de oxigênio. Neste cenário, sugere-se que o efeito benéfico da LA no

acuponto E36 esteja relacionado a uma ação protetora nos níveis de estresse oxidativo pela diminuição da ROS e LOOH.

Para avaliar por qual mecanismo a LA exerce seu efeito anti-edematogênico, o edema de pata foi induzido por diferentes mediadores inflamatórios. O processo inflamatório é iniciado imediatamente após uma lesão aguda pelos seus mediadores químicos: histamina, responsável pelo aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação; PGE2 molécula pró-inflamatória com a função de vasodilatação e indução da febre; e bradicinina, que também possui função vasodilatadora e é responsável por controlar a hipersensibilidade da dor inflamatória aguda (WANG *et al.*, 2005; BOSCHI *et al.*, 2008; MEDZHITOV, 2008). Dados recentes mostraram que a terapia LASER tem um efeito modulador sobre mediadores inflamatórios, como as PG2, TNF- α , IL-1 β , COX-1 e COX-2 (ALVES *et al.*, 2013). Por exemplo, Bjordal e colaboradores (2006) demonstraram que a terapia LASER reduz significativamente a ação dos mediadores inflamatórios bioquímicos e produz efeito anti-inflamatório nas células e tecidos mole. Considerando os resultados obtidos com LA no acuponto E36, é possível sugerir que essa redução acontece pela diminuição do edema na pata induzida pelos mediadores inflamatórios PG2, HIST e BK, conforme descritos na tabela 2. Esses dados corroboram com estudos anteriores, como o de da Silva *et al.* (2011) e de Alves *et al.* (2013), que relataram o efeito anti-inflamatório da acupuntura na fase aguda por meio da estimulação dos acupontos, assim como os resultados de De Jesus (2014) em pesquisa sobre o tratamento do modelo inflamatório no tendão de Aquiles em ratos, utilizando a terapia LASER de AsGaAl, onde observaram redução dos níveis de PG2. Porém, para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvendo o efeito anti-inflamatório LA, não somente anti-edematogênico, seriam necessários estudos complementares em outras análises no modelo induzido pela carragenina, como avaliar a atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO), a migração celular e os níveis das citocinas pró-inflamatórias. O presente estudo indica resultados parciais da ação anti-inflamatória, principalmente anti-edematogênica da LA no acuponto E36, conforme ilustrado na figura 28.

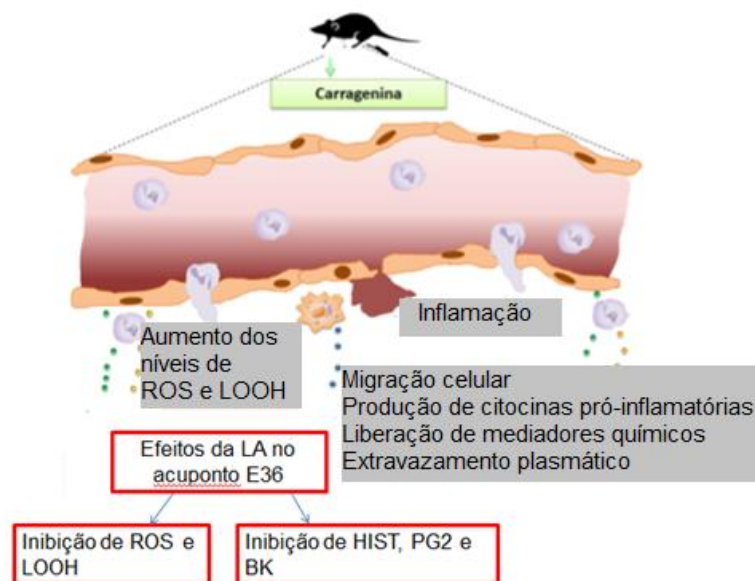


Figura 28: Esquema adaptado de Da Silva *et al.* (2011), indução da carragenina, efeitos inflamatórios e efeito anti-inflamatório parcial da LA no acuponto E36.

5.2 Atividade anti-inflamatória da LASER acupuntura no acuponto E36 no modelo de edema de pata induzido pela carragenina por meio da análise termográfica

Um dos sinais característicos da inflamação é o calor resultante do aumento do metabolismo celular. Desta maneira, pode ser avaliado por medição de temperatura (BANDEIRA, 2012). Por isso, um dos métodos de avaliação utilizado neste estudo para analisar o efeito anti-inflamatório da LA foi a termografia. Pesquisas recentes indicam o uso dessa tecnologia como um método complementar e eficaz para diagnóstico de doenças inflamatórias, como bursite, tendinite, entre outras (CHEN, 2011), assim como para a investigação dos efeitos da acupuntura em modelos inflamatórios (LITSCHER, 2005) e mudanças de temperatura em neonatos (KURATH-KOLLER *et al.*, 2015). A termografia infravermelha tem vantagens sobre outros métodos de diagnóstico por ser um método não invasivo, rápido, confiável, sem contato físico, e é capaz de produzir várias gravações em intervalos de tempo curtos, sendo seguro para pacientes e corpo clínico (CHEN e LV, 2011; KURATH-KOLLER *et al.*, 2015). Inclusive, Banic *et al.* 2012 concluíram que o diagnóstico realizado com a termografia infravermelha é um método viável, importante e não invasivo na avaliação de pacientes com grave inflamação no intestino (BANIC, 2011).

Bandeira *et al.* (2012) também indicam a termografia para diagnóstico e evolução de inflamação em afecções musculoesqueléticas (BANDEIRA, 2012). Recentemente, Kurath-Koller e colaboradores (2015) utilizaram a termografia para analisar os efeitos térmicos da LA em neonatos. Aplicaram LASER vermelho (685 nm) no acuponto IG4 (Hegu) por 1, 5 e 10 min, em uma potência de 15 mW, concluíram o estudo demonstrando que não houve qualquer evento adverso ou um significativo aumento da temperatura depois da aplicação; assim como Balestra e colaboradores que não constataram alteração alguma de temperatura na região do músculo masseter após aplicação de LASER, na densidade de energia 7,5 J/cm², em indivíduos saudáveis. Entretanto, alguns autores relatam que o LASER é capaz de aumentar a circulação periférica e, conseqüentemente, a temperatura em até 0,5°C no local aplicado (HERD *et al.*, 1997). Os resultados aqui obtidos apontam para uma redução na temperatura da pele na superfície plantar da pata traseira dos camundongos tratados com LASER ON no acuponto E36, em modelo inflamatório agudo, sugerindo que a aplicação da LA tem efeito anti-inflamatório. Provavelmente, a redução de temperatura ocasionada no tratamento de LA, pode ter ocorrido em razão ao seu efeito anti-inflamatório e/ou por aumento do fluxo sanguíneo periférico, promovendo um resfriamento no tecido superficial (BALESTRA, 2011). Este resultado é inédito, pois não foram encontrados na literatura outros estudos utilizando a mesma metodologia.

5.3 Atividade antinociceptiva da LASER acupuntura no acuponto E36 em modelos de nocicepção química

Desde o final do século 19, modelos de nocicepção são utilizados para comprovar a eficácia de vários tratamentos. Os modelos em animais têm sido cruciais para o entendimento do processo da dor e eficácia de seus tratamentos farmacológicos ou não farmacológicos (GREGORY *et al.*, 2013). Neste estudo, um dos modelos escolhidos foi o de nocicepção induzida pelo glutamato. O glutamato é um importante aminoácido excitatório na transmissão da dor periférica e central (BEIRITH *et al.*, 2002). Foi observado que a LA no acuponto E36 reduz a resposta nociceptiva induzida pela injeção de glutamato. Na literatura, não foram encontrados estudos semelhantes utilizando a LA como

tratamento neste modelo, apenas com EA mostrando que o estímulo aplicado nos acupontos VB30 e VB34 conseguiu inibir significativamente a transmissão nociva do glutamato na medula espinal (ZHANG *et al.*, 2014). Os autores sugerem que a eletroacupuntura aumenta a liberação de noradrenalina (ativação dos receptores adrenérgicos α_2) pré-sináptica na medula espinal inibindo a fosforilação dos receptores GluN1, conseqüentemente, diminuindo a liberação do glutamato. Como o tratamento da LA no acuponto E36 apresentou efeito antinociceptivo, iniciou-se a avaliação de possíveis mecanismos de ação envolvidos nessa resposta.

Outros modelos escolhidos que participam da condução dos estímulos nocivos foram os modelos de nocicepção aguda induzidos pela capsaicina e cinamaldeído, que comprovam a participação dos receptores TRPs (GOLD, 1999). A injeção de capsaicina, agonista seletivo dos canais TRPV1, produz inflamação neurogênica local, que é um fenômeno de vasodilatação das artérias ocasionando aumento do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, edema (KALIL-GASPAR, 2003; GREGORY *et al.*, 2013). O cinamaldeído, agonista seletivo dos canais TRPA1, ativado em temperaturas abaixo de 17 °C induz a dor (CALIXTO *et al.*, 2005; GREGORY *et al.*, 2013). Neste estudo, constatou-se que a LA reduz significativamente as respostas nociceptivas induzidas pelas injeções de capsaicina ou cinamaldeído. Considerando esses resultados, pode-se sugerir que a LA no acuponto E36 está relacionada à inibição dos canais TRPV1 e TRPA1.

5.4 Atividade antinociceptiva do LASER acupuntura no acuponto E36 no modelo de neuropatia induzida pela LPNC e no modelo de nocicepção inflamatória crônica (CFA)

Os modelos discutidos anteriormente foram de nocicepção e inflamação aguda: porém, a dor crônica atinge milhões de pessoas, custa anualmente trilhões de dólares ao governo americano, requer cuidados especiais, pode levar à perda de emprego, diminui a qualidade de vida e é de difícil tratamento (GREGORY *et al.*, 2013). Por esses motivos, analisou-se também, a eficiência da LA no acuponto E36, em modelos de nocicepção crônicos.

Existem vários modelos que avaliam a dor crônica, dentre eles, os modelos experimentais com compressão do nervo ciático em ratos e camundongos. Esse modelo é utilizado devido à semelhança do nervo ciático de humanos e por imitar a sintomatologia da lombociatalgia, podendo assim, avaliar a dor neuropática (BERTOLINI *et al.*, 2011). A ciatalgia é uma forma de dor radicular e é descrita como uma doença do sistema periférico e uma das principais causas de falta ao trabalho, com elevado custo financeiro para os serviços de saúde (BERTOLINI *et al.*, 2011). Os resultados aqui apresentados mostraram pela primeira vez que a LA no acuponto E36 foi capaz de reduzir significativamente a hipersensibilidade mecânica induzida pela LPNC, do primeiro dia de aplicação até o oitavo dia de tratamento, sendo efetivo na dor neuropática por um determinado período. Bertolini e colaboradores (2011) avaliaram a melhora da nocicepção no modelo experimental de dor ciática, utilizando terapia LASER em cinco sessões diárias, com comprimento de onda de 830 nm, doses de 4 e 8 J/cm² e potência de 30 mW, por meio da análise da marcha. Ambas as doses utilizadas produziram redução dos níveis de dor nos animais; porém, não houve redução significativa antes do final das cinco aplicações, diferentemente dos resultados obtidos nesta pesquisa, pois a antinocicepção inicia-se a partir da primeira aplicação. Não existem trabalhos que mostrem o efeito da LA no acuponto E36 na dor crônica com os parâmetros utilizados nessa pesquisa. Por esse motivo, pode-se sugerir que a diferença no número de aplicações na redução da hipersensibilidade mecânica possa ser devido aos parâmetros utilizados e também à resposta do ponto de acupuntura. Entretanto, nos resultados obtidos neste trabalho (figura 22) o tratamento a longo prazo com terapia LASER, sobre o mesmo ponto de acupuntura, uma vez por dia, não reduziu a resposta da alodinia mecânica induzida por LPNC a partir do oitavo dia de tratamento, sugerindo acomodação de estímulo; por esse motivo, não é uma técnica importante para o tratamento contínuo de dores crônicas. Diferentemente de pesquisas com animais, no modelo de LPNC, utilizando acupuntura manual nos acupontos E36 e BP6, que denotaram redução da hipersensibilidade mecânica desde o 1° até o 44° dia (CIDRAL-FILHO *et al.*, 2011). Essa diferença entre os resultados encontrados no presente estudo e em pesquisas anteriores sugere que a duração do efeito antinociceptivo em modelo de nocicepção crônica depende do estímulo realizado no acuponto.

O CFA é um modelo de inflamação crônica, esse agente pode ser injetado na pata, no músculo, na articulação e na cauda (GREGORY *et al.*, 2013). Neste trabalho, utilizou-se a aplicação do CFA na pata, conforme descrito no Capítulo 3. Os dados obtidos e descritos sugerem efeito antiinflamatório da LA no acuponto E36 por inibição da alodínia mecânica, no teste dos filamentos de von Frey. Huang e colaboradores (2013) encontraram resultados semelhantes no modelo de CFA, utilizando EA no acuponto E36, em uma frequência de 2 Hz, inibindo a hipersensibilidade mecânica e térmica em animais com dor inflamatória, por meio do teste do filamento de von Frey, teste de Hargreaves e os testes de placa quente/frio (HUANG *et al.*, 2013). Entretanto, os resultados aqui obtidos indicam que o efeito da técnica permaneceu até o oitavo dia após a primeira aplicação, semelhante aos resultados no modelo da LPNC. Este dado é muito relevante, pois novamente sugere que o tratamento com LA pode ocasionar certa acomodação quando sua aplicação é prolongada.

5.5 Participação da LASER acupuntura no acuponto E36 nos sistemas adrenérgico, colinérgico e adenosinérgico no modelo de nocicepção químico induzido pelo glutamato.

A fim de identificar os mecanismos de ação pelos quais a LA promove o efeito antinociceptivo no acuponto E36, os sistemas alfa e beta-adrenérgicos, colinérgicos e adenosinérgicos foram testados com pré-tratamentos antagonistas de tais sistemas, para avaliar se algum deles modificaria os resultados antinociceptivos encontrados no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato. No envolvimento com a antinocicepção, as vias descendentes α -adrenérgicas são recrutadas a partir de estímulos nas estruturas cerebrais, como na substância cinzenta periaquedutal (PAG) (MILLAN, 2002; MUROTANI *et al.*, 2010). Os receptores adrenérgicos participam do sistema modulatório descendente da dor e são compostos por três classes principais: α_1 , α_2 e β -adrenoceptores (PARK *et al.*, 2013). Existem evidências que sugerem que os receptores α_1 -adrenérgicos são responsáveis por modular o processamento nociceptivo no corno dorsal da medula espinal (MILLAN, 2002). Já os receptores agonistas α_2 -adrenérgicos, possuem propriedades antinociceptivas que

influenciam na modulação dos neurônios excitatórios em projeções aferentes primárias (MILLAN, 2002).

O envolvimento do sistema adrenérgico sobre o efeito antinociceptivo da LA foi mostrado por meio do pré-tratamento dos animais com antagonistas não-seletivos de receptores adrenérgicos. Em seguida, a participação do sistema adrenérgico nos receptores α_1 e α_2 sobre a LA no E36 foi investigada. Os resultados apresentados na figura 25 mostram que a prazosina (antagonista seletivo de receptor α_1 -adrenérgico) reverteu o efeito antinociceptivo do pré-tratamento com a fenilefrina (agonista seletivo do receptor α_1 -adrenérgico), mas o efeito antinociceptivo da radiação LASER no acuponto E36 não foi revertida pelo grupo com prazosina no modelo induzido pelo glutamato. Porém, os resultados da figura 26 mostram que o efeito antinociceptivo da radiação com LASER foi revertido pela loimbina (antagonista seletivo do receptor α_2 -adrenérgico) mostrando envolvimento do receptor α_2 -adrenérgico na LA. Kwon e seus colegas (2001), usando a injeção do veneno de abelha no ponto de acupuntura VC12 (Zhongwan), mostraram o efeito antinociceptivo da acupuntura pelo envolvimento do receptor α_2 -adrenérgico (KWON *et al.*, 2001). No entanto, neste estudo, avaliou-se ambos os receptores α_1 e α_2 -adrenérgicos e verificou-se que o receptor α_1 -adrenérgico não parece estar envolvido na ação antinociceptiva da estimulação com LASER no acuponto E36, corroborando com os resultados de Park e colaboradores (2013), que concluíram que a ação antinociceptiva da EA, com frequência de 2 Hz no E36 é reduzida pela ação dos receptores α_2 e β -adrenérgicos e não por meio de α_1 -adrenérgicos. Estudos indicam a hipótese que os receptores α_2 -adrenérgicos diminuem a liberação de glutamato por meio do aumento da quantidade de norepinefrina espinal inibindo a fosforilação do receptor GluN1 no tratamento com EA com frequências de 2 a 10 Hz (ZHANG *et al.*, 2014). Os achados da presente pesquisa sugerem que o efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36 parece também estar associado a esse mecanismo.

Segundo Park e colaboradores (2013), os efeitos analgésico da EA são mediados principalmente por receptores opiodérgicos, adrenérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos e GABAérgicos. Por este motivo, o presente estudo também analisou a participação do sistema colinérgico, receptores muscarínicos, no efeito antinociceptivo da LA no acuponto E36. Para confirmar

sua participação foi administrado um antagonista não-seletivo de receptores muscarínicos (atropina), e observou-se a reversão do efeito antinociceptivo da LA, indicando que esta técnica ativa receptores muscarínicos. Da mesma maneira, Beak e colaboradores (2005) mostraram que os efeitos analgésicos da EA na dor inflamatória no modelo CIA foram bloqueados pela atropina (BAEK *et al.*, 2005). Segundo Zhang e colaboradores (2014) o efeito antinociceptivo da EA acontece porque a técnica induz a liberação de vários neurotransmissores, entre eles, a acetilcolina, neurotransmissor dos receptores muscarínicos que atua de forma interativa para inibir a dor.

Outro sistema importante no efeito da acupuntura manual é o sistema adenosinérgico. Para confirmar a participação dos receptores adenosinérgicos, administrou-se o pré-tratamento sistêmico de camundongos com a cafeína (3 mg/kg, i.p, um antagonista não seletivo de receptores adenosinérgicos), conforme ilustrado na figura 27, foi capaz de reverter significativamente a antinocicepção causada pela LA no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato. A cafeína é um antagonista dos receptores de adenosina inibindo seu efeito antinociceptivo (MORE *et al.*, 2013). Os resultados de Goldman *et al.* (2010) indicam que a adenosina possui resposta de ação central decorrente de estímulos mecânicos gerados por agulhas de acupuntura, como os resultados aqui obtidos nos experimentos com LA. Assim como Takano *et al.* (2012), em seus experimentos com seres humanos, realizaram a punção no acuponto E36 com agulhas, em indivíduos saudáveis e encontraram evidências importantes do papel da adenosina no efeito antinociceptivo da acupuntura. Segundo De Oliveira *et al.* (2015), em sua revisão da literatura, concluiu-se que a acupuntura, assim como a LA, aumenta a liberação de adenosina, que possui propriedade antinociceptiva. O mecanismo pelo qual a acupuntura interage com o sistema adenosinérgico é por meio do aumento de liberação do ATP, e este pode ser metabolizado em ADP, AMP e adenosina. A adenosina ativa os receptores A1, inibindo a nocicepção (MORE *et al.*, 2013). O presente estudo confirma dados anteriores da literatura, comprovando que os receptores adenosinérgicos estão envolvidos na analgesia induzida por LA.

6 CONCLUSÕES

Neste capítulo, apresentam-se as principais conclusões extraídas a partir da metodologia experimental aplicada e dos resultados obtidos; as principais contribuições científicas auferidas com a pesquisa desenvolvida; e encerra-se com as perspectivas de trabalhos futuros, principalmente a de aplicação da LA em seres humanos.

Em síntese, os resultados obtidos nessa pesquisa permitem concluir que:

- (1) o tratamento com LA por 10 s, no acuponto E36, possui ação anti-inflamatória de até 4 h no modelo de edema de pata induzido pela carragenina, semelhante a dexametasona, e seu mecanismo parece estar associado à redução de ROS, LOOH, BK, HIST e PG2;
- (2) o tratamento com LA no acuponto E36 promove um efeito antinociceptivo nos modelos de nocicepção química do glutamato, capsaicina e cinamaldeído, sugerindo ação nos recetores glutamatérgicos, TRPV1 e TRPA1;
- (3) no efeito antinociceptivo (LPNC), o tratamento com LA no acuponto E36 evidenciou redução da alodínia mecânica; porém, na aplicação diária, o efeito não permanece após o 9º dia, indicando com os resultados obtidos que a LA provavelmente é uma técnica eficiente para tratamentos de curto prazo;
- (4) no efeito anti-inflamatório (CFA) crônico, o tratamento da LA no acuponto E36 evidenciou redução da alodínia mecânica; porém, como relatado, na aplicação diária, o efeito não permanece após o 9º dia;
- (5) os sistemas do mecanismo de ação do efeito antinociceptivo pelo qual a LA no acuponto E36 atua parecem estar ligados aos sistemas muscarínicos, adrenérgicos α_2 e adenosinérgicos.

Portanto, conclui-se que os dados obtidos acrescentam aos encontrados na literatura novos achados e que o LASER aplicado no acuponto E36 possui importante ação antinociceptiva e anti-inflamatória aguda e crônica. No ponto de vista filosófico da MTC, podemos concluir em relação a aplicação da acupuntura, a qual utiliza punturamento em sedação ou tonificação nos acupontos, que a densidade de energia aplicada neste trabalho com o LASER teve um efeito significativo em sedação.

6.1 CONTRIBUIÇÕES DA PESQUISA

Como principais contribuições científicas desta pesquisa enumeram-se:

- (1) a descrição de uma metodologia eficiente para o tratamento da dor e inflamação aguda e crônica utilizando LA no acuponto E36, nos seguintes parâmetros: dose de 4 J/cm^2 , tempo de 10 s, potência de 30 mW, comprimento de onda de 830 nm, modo contínuo e tipo AsGaAl. O protocolo realizado por meio da aplicação da LA produziu efeito significativo nos modelos propostos, mostrando que a técnica é eficaz para o tratamento da dor e inflamação;
- (2) os achados sugerem os mecanismos de ação pelos quais a LA no acuponto E36 atua em seu efeito antinociceptivo: participação dos receptores glutamatérgicos, TRPV1, TRPA1, muscarínicos, adrenérgicos α_2 e adenosinérgicos, e em seu efeito anti-inflamatório, por meio da redução de ROS, LOOH, BK, HIST e PG2;
- (3) o trabalho realça a importância de uma nova tecnologia para a área da saúde e sua expressiva e relevante contribuição para a Ciência, auxiliando em novas pesquisas na área de LA.

6.2 TRABALHOS FUTUROS

A continuação de trabalhos na linha de pesquisa com acupuntura LASER seria de grande importância principalmente para a prática clínica em seres humanos. Porém, necessita-se de mais estudos, já que os resultados dependem de inúmeras variáveis, principalmente a técnica com LASER, que possui um número limitado de estudos realizados e falta de divulgação de suas experiências clínicas.

Sugere-se a extensão de estudos em:

- (1) utilização de LA em outros acupontos descritos na literatura como analgésicos e anti-inflamatórios, por exemplo: "Sanjiao" (BP6) e "Hegu" (IG4), que são utilizados na prática clínica como acupontos para dores e inflamação. Ainda não existem trabalhos aplicando e comparando a técnica em diferentes acupontos;
- (2) aplicação de outras doses (5 e 6 J/cm^2) e potências maiores do LASER AsGaAl, para verificar a eficácia de novos parâmetros. Desta forma, pode-se

comparar outras doses na LA, e verificar se as mesmas apresentarão diferenças nos resultados;

(3) a aplicação de outras doses nos modelos de dor neuropática com o LASER AsGaAl, para verificar se existe acomodação do estímulo no oitavo dia. Como existem resultados indicando que a aplicação de agulha (estímulo mecânico) no acuponto melhora o resultado antinociceptivo a partir do oitavo dia, faz-se necessário outras doses para elucidar o resultado obtido neste trabalho;

(4) comparação entre outros LASERs, como LASER HeNe, pois há uma enorme carência científica de estudos relacionados aos LASERs de baixa potência na área de acupuntura. Assim, pode-se verificar se existe diferença nos resultados com o emprego de diferentes tecnologias LASER aplicadas na LA;

(5) utilização da LA em seres humanos no acuponto “Zusanli” (E36), com diferentes comprimentos de onda, potências, densidades energéticas, assim como diferentes frequências, devido ao tecido humano possuir características diferentes do tecido dos ratos e pela dor em humanos ser bastante influenciada pelo estado psicológico;

(6) comparar o uso do LASER com a eletroacupuntura, para verificar se ocorre uma diferença na ação no acuponto “Zusanli” (E36) entre os estímulos, já que há indícios que mostram significância da analgesia produzida pela eletroacupuntura neste acuponto.

6.3 COMENTÁRIOS FINAIS

O tema da pesquisa realizada envolve o incremento no conhecimento da LASER acupuntura, por meio da união de uma técnica milenar com a aplicação de uma nova tecnologia, indolor e sem efeitos colaterais para o tratamento de sintomas que geram grande sofrimento aos seres humanos. Os achados desta tese contribuem de forma direta e indireta às pessoas com sintoma de dor, nas áreas de saúde e tecnologia, em particular, como um importante auxílio para os profissionais da área de saúde, no tratamento da dor e inflamação. Por fim, pode-se inferir que a maior contribuição científica do estudo realizado recai sobre a comprovação dos efeitos analgésicos e antiinflamatórios proporcionados pela radiação LASER de baixa potência na técnica da acupuntura, demonstrando,

desse modo, uma efetiva resposta fisiológica e vislumbrando, assim, um futuro promissor para a integração das modernidades tecnológicas com a prática da acupuntura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, T. F., ROIZENBLATT, S. e TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**, v.1000, n.1-2, p.40-56, Mar 12, 2004.

ALVES, A. C., DE CARVALHO, P. T., PARENTE, M., XAVIER, M., FRIGO, L., AIMBIRE, F., LEAL JUNIOR, E. C. e ALBERTINI, R. Low-level laser therapy in different stages of rheumatoid arthritis: a histological study. **Lasers Med Sci**, v.28, n.2, p.529-36, Feb, 2013.

ANDRADE, E. L., LUIZ, A. P., FERREIRA, J. e CALIXTO, J. B. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience**, v.152, n.2, p.511-20, Mar 18, 2008.

ARTES-RIBAS, M., ARNABAT-DOMINGUEZ, J. e PUIGDOLLERS, A. Analgesic effect of a low-level laser therapy (830 nm) in early orthodontic treatment. **Lasers Med Sci**, v.28, n.1, p.335-41, Jan, 2013.

ARTIGAS, F., ROMERO, L., DE MONTIGNY, C. e BLIER, P. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT1A antagonists. **Trends Neurosci**, v.19, n.9, p.378-83, Sep, 1996.

AVCI, P., GUPTA, A., SADASIVAM, M., VECCHIO, D., PAM, Z., PAM, N. e HAMBLIN, M. R. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Semin Cutan Med Surg**, v.32, n.1, p.41-52, Mar, 2013.

BAEK, Y. H., CHOI, D. Y., YANG, H. I. e PARK, D. S. Analgesic effect of electroacupuncture on inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: mediation by cholinergic and serotonergic receptors. **Brain Res**, v.1057, n.1-2, p.181-5, Sep 28, 2005.

BALESTRA, C. M. O., J. L. R.; NICOLAU, R. A.; DIAS, R. S. S. . Análise termográfica da região de masseter após irradiação com laser ou LED – estudo clínico. **ConScientiae Saúde**, v.10, n.1, p.17-22, 2011.

BANDEIRA, F. M., M. A. M.; SOUZA, M. A.; NOHAMA, P.; NEVES, E. B. . Pode a Termografia auxiliar no diagnóstico de lesões musculares em atletas de futebol? **Rev Bras Med Esporte**, v.18, p.246-250, 2012.

BANIC, M. K., D.; BOROJEVIC, N.; FERENCIC, Z.; PLESKO, S.; PETRICUSIC, S.; BOZIN, T.E ANTONINI, S. . Thermography in patients with inflammatory bowel disease and colorectal cancer: evidence and review of the method. **Periodicum Biologorum**, v.113, n.4, p.439–444, 2011.

BARATTO, L., CALZA, L., CAPRA, R., GALLAMINI, M., GIARDINO, L., GIULIANI, A., LORENZINI, L. e TRAVERSO, S. Ultra-low-level laser therapy. **Lasers Med Sci**, v.26, n.1, p.103-12, Jan, 2011.

BARDIN, L., LAVARENNE, J. e ESCHALIER, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. **Pain**, v.86, n.1-2, p.11-8, May, 2000.

BASBAUM, A. I. Descending control of pain transmission: possible serotonergic-enkephalinergic interactions. **Adv Exp Med Biol**, v.133, p.177-89, 1981.

BASBAUM, A. I., BAUTISTA, D. M., SCHERRER, G. e JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v.139, n.2, p.267-84, Oct 16, 2009.

BASBAUM, A. I. B., C. . **Science of pain**. Oxford, U.K: Elsevier. 2009

BAXTER, D. G. **Therapeutic lasers. Theory and practice**. 1994

BAXTER, G. D., BLEAKLEY, C. e MCDONOUGH, S. Clinical effectiveness of laser acupuncture: a systematic review. **J Acupunct Meridian Stud**, v.1, n.2, p.65-82, Dec, 2008.

BEIRITH, A., SANTOS, A. R. e CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res**, v.924, n.2, p.219-28, Jan 11, 2002.

BERTOLINI, G. R., ARTIFON, E. L., SILVA, T. S., CUNHA, D. M. e VIGO, P. R. Low-level laser therapy, at 830 nm, for pain reduction in experimental model of rats with sciatica. **Arq Neuropsiquiatr**, v.69, n.2B, p.356-9, 2011.

BESSON, J. M. [The complexity of physiopharmacologic aspects of pain]. **Drugs**, v.53 Suppl 2, p.1-9, 1997.

BJORDAL, J. M., JOHNSON, M. I., IVERSEN, V., AIMBIRE, F. e LOPES-MARTINS, R. A. Low-level laser therapy in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. **Photomed Laser Surg**, v.24, n.2, p.158-68, Apr, 2006.

BLEAKMAN, D., ALT, A. e NISENBAUM, E. S. Glutamate receptors and pain. **Semin Cell Dev Biol**, v.17, n.5, p.592-604, Oct, 2006.

BOSCHI, E. S., LEITE, C. E., SACIURA, V. C., CABERLON, E., LUNARDELLI, A., BITENCOURT, S., MELO, D. A. e OLIVEIRA, J. R. Anti-Inflammatory effects of low-level laser therapy (660 nm) in the early phase in carrageenan-induced pleurisy in rat. **Lasers Surg Med**, v.40, n.7, p.500-8, Sep, 2008.

CABRERA, E. B. A. P., J.M.R.; ALFONSO, L.E. Laseracupuntura con Helio-Neón en el tratamiento de pacientes traumatizados. **Rev. Cubana Med. Milit.**, v.31, p.5-12, 2002.

CALIXTO, J. B., KASSUYA, C. A., ANDRE, E. e FERREIRA, J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacol Ther**, v.106, n.2, p.179-208, May, 2005.

CARATI, C. J., ANDERSON, S. N., GANNON, B. J. e PILLER, N. B. Treatment of postmastectomy lymphedema with low-level laser therapy: a double blind, placebo-controlled trial. **Cancer**, v.98, n.6, p.1114-22, Sep 15, 2003.

CARROLL, J. D., MILWARD, M. R., COOPER, P. R., HADIS, M. e PALIN, W. M. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. **Dent Mater**, v.30, n.5, p.465-75, May, 2014.

CARTER, G. T. e SULLIVAN, M. D. Antidepressants in pain management. **Curr Opin Investig Drugs**, v.3, n.3, p.454-8, Mar, 2002.

CARVALHO, W. A. A. L., L. . Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapeuticos **Rev Bras Anesthesiol**, v.48, n.2, p. 137-158, 1998.

CASTARDO, J. C., PRUDENTE, A. S., FERREIRA, J., GUIMARAES, C. L., MONACHE, F. D., FILHO, V. C., OTUKI, M. F. e CABRINI, D. A. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **J Ethnopharmacol**, v.118, n.3, p.405-11, Aug 13, 2008.

CATÃO, M. H. C. V. Os Benefícios do Laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. **Revista Brasileira de Patologia Oral**, v.3, p.214-218, 2004.

CHAPLAN, S. R., BACH, F. W., POGREL, J. W., CHUNG, J. M. e YAKSH, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**, v.53, n.1, p.55-63, Jul, 1994.

CHAPMAN, C. R. e GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **Lancet**, v.353, n.9171, p.2233-7, Jun 26, 1999.

CHEN, R. e LV, Z. Infrared thermography fails to visualize stimulation-induced meridian-like structures: comment by Rixin Chen and Zhimai Lv and reply from Gerhard Litscher. **Biomed Eng Online**, v.10, p.80; author reply 80, 2011.

CHEN, R. L., Z.; LITSCHER. Infrared thermography fails to visualize stimulation-induced meridian-like structures: comment by Rixin Chen and Zhimai Lv and reply from Gerhard Litscher. **Biomed Eng Online**, v.10, p.80; author reply 80, 2011.

CHEN, W. H., HSIEH, C. L., HUANG, C. P., LIN, T. J., TZEN, J. T., HO, T. Y. e LIN, Y. W. Acid-sensing ion channel 3 mediates peripheral anti-hyperalgesia effects of acupuncture in mice inflammatory pain. **J Biomed Sci**, v.18, p.82, 2011.

CHOW, R. T., JOHNSON, M. I., LOPES-MARTINS, R. A. e BJORDAL, J. M. Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic

review and meta-analysis of randomised placebo or active-treatment controlled trials. **Lancet**, v.374, n.9705, p.1897-908, Dec 5, 2009.

CIDRAL-FILHO, F. J., DA SILVA, M. D., MORE, A. O., CORDOVA, M. M., WERNER, M. F. e SANTOS, A. R. Manual acupuncture inhibits mechanical hypersensitivity induced by spinal nerve ligation in rats. **Neuroscience**, v.193, p.370-6, Oct 13, 2011.

COLLS, J. **La terapia Láser, hoy**. Barcelona. 1984. 206 p.

CRAIG, A. D., ZHANG, E. T. e BLOMQUIST, A. A distinct thermoreceptive subregion of lamina I in nucleus caudalis of the owl monkey. **J Comp Neurol**, v.404, n.2, p.221-34, Feb 8, 1999.

DA SILVA, J. A. E. R.-F., N. P. A dor como um problema psicofísico. **Rev Dor.**, v.12, n.2, p.138-51, 2011.

DA SILVA, M. D., GUGINSKI, G., WERNER, M. F., BAGGIO, C. H., MARCON, R. e SANTOS, A. R. Involvement of Interleukin-10 in the Anti-Inflammatory Effect of Sanyinjiao (SP6) Acupuncture in a Mouse Model of Peritonitis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.2011, p.217946, 2011.

DAVIES, S. N. e LODGE, D. Evidence for involvement of N-methylaspartate receptors in 'wind-up' of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat. **Brain Res**, v.424, n.2, p.402-6, Oct 27, 1987.

DE JESUS, J. F., SPADACCI-MORENA, D. D., DOS ANJOS RABELO, N. D., PINFILDI, C. E., FUKUDA, T. Y. e PLAPLER, H. Low-level laser therapy in IL-1beta, COX-2, and PGE2 modulation in partially injured Achilles tendon. **Lasers Med Sci**, Jul 29, 2014.

DE OLIVEIRA, R. F., DA SILVA, C. V., CERSOSIMO, M. C., BORSATTO, M. C. e DE FREITAS, P. M. Laser therapy on points of acupuncture: Are there benefits in dentistry? **J Photochem Photobiol B**, v.151, p.76-82, Jul 11, 2015.

DECOSTERD, I. B., T. . **Animal Models and Neuropathic Pain**. In: **BASBAUM, A. I. (org.); BUSHNELL, M.C. (org.)**. . Oxford, UK: Elsevier Inc. 2009. 857-864 p.

DHAMI, G. K. e FERGUSON, S. S. Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. **Pharmacol Ther**, v.111, n.1, p.260-71, Jul, 2006.

DICKENSON, A. H. NMDA receptor antagonists: interactions with opioids. **Acta Anaesthesiol Scand**, v.41, n.1 Pt 2, p.112-5, Jan, 1997.

DOR, S. B. P. O. E. D. **Jornal da Dor**. 2015 2014.

DRIVER, A. S., KODAVANTI, P. R. e MUNDY, W. R. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. **Neurotoxicol Teratol**, v.22, n.2, p.175-81, Mar-Apr, 2000.

EBNESHAHIDI, N. S., HESHMATIPOUR, M., MOGHADDAMI, A. e EGHTESSADI-ARAGHI, P. The effects of laser acupuncture on chronic tension headache--a randomised controlled trial. **Acupunct Med**, v.23, n.1, p.13-8, Mar, 2005.

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.

ERTHAL, V., DA SILVA, M. D., CIDRAL-FILHO, F. J., SANTOS, A. R. e NOHAMA, P. ST36 laser acupuncture reduces pain-related behavior in rats: involvement of the opioidergic and serotonergic systems. **Lasers Med Sci**, v.28, n.5, p.1345-51, Sep, 2013.

FABRE, H. S., NAVARRO, R. L., OLTRAMARI-NAVARRO, P. V., OLIVEIRA, R. F., PIRES-OLIVEIRA, D. A., ANDRAUS, R. A., FUIRINI, N. e FERNANDES, K. B. Anti-inflammatory and analgesic effects of low-level laser therapy on the postoperative healing process. **J Phys Ther Sci**, v.27, n.6, p.1645-8, Jun, 2015.

FEIN, A. NOCICEPTORES: As células que sentem dor. NOCICEPTORS: The Cells That Sense Pain. D. O. Line. Riberão Preto: <http://www.dol.inf.br/nociceptores> 2011.

FERREIRA, D. C. A. R., A. R.; TORRES, C. P.; GALO, R.; PAULA-SILVA, F. W. G.; QUEIROZ, A. M. . Effect of laser acupuncture and auricular acupressure in a child with trismus as a sequela of medulloblastoma. **Acupunct Med**, v.0, p.1-4, 2014.

FIELDS, H. L., HEINRICHER, M. M. e MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annu Rev Neurosci**, v.14, p.219-45, 1991.

FORNASARI, D. e COACCIOLI, S. Pharmacology of pain. **Reumatismo**, v.66, n.1, p.14-7, 2014.

FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res Bull**, v.48, n.2, p.129-41, Jan 15, 1999.

GALLIN, J. I., FLETCHER, M. P., SELIGMANN, B. E., HOFFSTEIN, S., CEHRS, K. e MOUNESSA, N. Human neutrophil-specific granule deficiency: a model to assess the role of neutrophil-specific granules in the evolution of the inflammatory response. **Blood**, v.59, n.6, p.1317-29, Jun, 1982.

GOLDMAN, N., CHEN, M., FUJITA, T., XU, Q., PENG, W., LIU, W., JENSEN, T. K., PEI, Y., WANG, F., HAN, X., CHEN, J. F., SCHNERMANN, J., TAKANO, T., BEKAR, L., TIEU, K. e NEDERGAARD, M. Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. **Nat Neurosci**, v.13, n.7, p.883-8, Jul, 2010.

GOTTSCHLING, S., MEYER, S., GRIBOVA, I., DISTLER, L., BERRANG, J., GORTNER, L., GRAF, N. e SHAMDEEN, M. G. Laser acupuncture in children with headache: a double-blind, randomized, bicenter, placebo-controlled trial. **Pain**, v.137, n.2, p.405-12, Jul 15, 2008.

GRACE, P. M., HUTCHINSON, M. R., MAIER, S. F. e WATKINS, L. R. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nat Rev Immunol**, v.14, n.4, p.217-31, Apr, 2014.

GREGORY, N. S., HARRIS, A. L., ROBINSON, C. R., DOUGHERTY, P. M., FUCHS, P. N. e SLUKA, K. A. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. **J Pain**, v.14, n.11, p.1255-69, Nov, 2013.

GRIFFIS, C. A., COMPTON, P. e DOERING, L. The effect of pain on leukocyte cellular adhesion molecules. **Biol Res Nurs**, v.7, n.4, p.297-312, Apr, 2006.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol Ther**, v.96, n.2-3, p.67-202, Nov-Dec, 2002.

HAWKINS, D. H. e ABRAHAMSE, H. Time-dependent responses of wounded human skin fibroblasts following phototherapy. **J Photochem Photobiol B**, v.88, n.2-3, p.147-55, Sep 25, 2007.

HERD, R. M., DOVER, J. S. e ARNDT, K. A. Basic laser principles. **Dermatol Clin**, v.15, n.3, p.355-72, Jul, 1997.

HERRERO, J. F., LAIRD, J. M. e LOPEZ-GARCIA, J. A. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? **Prog Neurobiol**, v.61, n.2, p.169-203, Jun, 2000.

HUANG, C. P., CHEN, H. N., SU, H. L., HSIEH, C. L., CHEN, W. H., LAI, Z. R. e LIN, Y. W. Electroacupuncture Reduces Carrageenan- and CFA-Induced Inflammatory Pain Accompanied by Changing the Expression of Nav1.7 and Nav1.8, rather than Nav1.9, in Mice Dorsal Root Ganglia. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.2013, p.312184, 2013.

HUANG, Y. Y., CHEN, A. C., CARROLL, J. D. e HAMBLIN, M. R. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response**, v.7, n.4, p.358-83, 2009.

JANG, H. e LEE, H. Meta-analysis of pain relief effects by laser irradiation on joint areas. **Photomed Laser Surg**, v.30, n.8, p.405-17, Aug, 2012.

JIANG, Z. Y., HUNT, J. V. e WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Anal Biochem**, v.202, n.2, p.384-9, May 1, 1992.

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

KALIL-GASPAR, P. Neuropeptides in the skin. **An Bras Dermatol**, v.78, n.4, p.483-498, 2003.

KAMIYA, H., NAKAMURA, J., HAMADA, Y., NAKASHIMA, E., NARUSE, K., KATO, K., YASUDA, Y. e HOTTA, N. Polyol pathway and protein kinase C activity of rat Schwannoma cells. **Diabetes Metab Res Rev**, v.19, n.2, p.131-9, Mar-Apr, 2003.

KAPUR, B. M., LALA, P. K. e SHAW, J. L. Pharmacogenetics of chronic pain management. **Clin Biochem**, v.47, n.13-14, p.1169-87, Sep, 2014.

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.

KATSOULIS, J., AUSFELD-HAFTER, B., WINDECKER-GETAZ, I., KATSOULIS, K., BLAGOJEVIC, N. e MERICSKE-STERN, R. Laser acupuncture for myofascial pain of the masticatory muscles. A controlled pilot study. **Schweiz Monatsschr Zahnmed**, v.120, n.3, p.213-25, 2010.

KESTON, A. S. e BRANDT, R. The Fluorometric Analysis of Ultramicro Quantities of Hydrogen Peroxide. **Anal Biochem**, v.11, p.1-5, Apr, 1965.

KIM, H. W., UH, D. K., YOON, S. Y., ROH, D. H., KWON, Y. B., HAN, H. J., LEE, H. J., BEITZ, A. J. e LEE, J. H. Low-frequency electroacupuncture suppresses carrageenan-induced paw inflammation in mice via sympathetic post-ganglionic neurons, while high-frequency EA suppression is mediated by the sympathoadrenal medullary axis. **Brain Res Bull**, v.75, n.5, p.698-705, Mar 28, 2008.

KINGSLEY, J. D., DEMCHAK, T. e MATHIS, R. Low-level laser therapy as a treatment for chronic pain. **Front Physiol**, v.5, p.306, 2014.

KURATH-KOLLER, S., LITSCHER, G., GROSS, A., FREIDL, T., KOESTENBERGER, M., URLESBERGER, B. e RAITH, W. Changes of locoregional skin temperature in neonates undergoing laser needle acupuncture at the acupuncture point large intestine 4. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.2015, p.571857, 2015.

KWEON, H. J. e SUH, B. C. Acid-sensing ion channels (ASICs): therapeutic targets for neurological diseases and their regulation. **BMB Rep**, v.46, n.6, p.295-304, Jun, 2013.

KWON, Y. B., KANG, M. S., HAN, H. J., BEITZ, A. J. e LEE, J. H. Visceral antinociception produced by bee venom stimulation of the Zhongwan acupuncture point in mice: role of alpha(2) adrenoceptors. **Neurosci Lett**, v.308, n.2, p.133-7, Aug 3, 2001.

LEE, J. H., JANG, K. J., LEE, Y. T., CHOI, Y. H. e CHOI, B. T. Electroacupuncture inhibits inflammatory edema and hyperalgesia through regulation of

cyclooxygenase synthesis in both peripheral and central nociceptive sites. **Am J Chin Med**, v.34, n.6, p.981-8, 2006.

LIM, H.D., KIM, M.H., LEE, C.Y. e NAMGUNG, U. Anti-inflammatory effects of acupuncture stimulation via the vagus nerve. **Plos One**, v.11, n.3, p.1-15, 2016.

LIMA, D. K., BALLICO, L. J., ROCHA LAPA, F., GONCALVES, H. P., DE SOUZA, L. M., IACOMINI, M., WERNER, M. F., BAGGIO, C. H., PEREIRA, I. T., DA SILVA, L. M., FACUNDO, V. A. e SANTOS, A. R. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents. **J Ethnopharmacol**, v.142, n.1, p.274-82, Jun 26, 2012.

LINS, R. D. A. U. D., E. M.; LUCENA, K. C. R.; CATÃO, M. H. C. V.; GRANVILLE-GARCIA, A. F.; NETO, L. G. C. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. **An Bras Dermatol**, v.85, n.6, p.849-55, 2010.

LITSCHER, G. Infrared thermography fails to visualize stimulation-induced meridian-like structures. **Biomed Eng Online**, v.4, p.38, 2005.

LITSCHER, G. Yes, There Is Deqi Sensation in Laser Acupuncture. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, 2012.

LITSCHER, G. e OPITZ, G. Technical Parameters for Laser Acupuncture to Elicit Peripheral and Central Effects: State-of-the-Art and Short Guidelines Based on Results from the Medical University of Graz, the German Academy of Acupuncture, and the Scientific Literature. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.2012, p.697096, 2012.

LOESER, J. D. e MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v.353, n.9164, p.1607-9, May 8, 1999.

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

LOPEZ-RAMIREZ, M., VILCHEZ-PEREZ, M. A., GARGALLO-ALBIOL, J., ARNABAT-DOMINGUEZ, J. e GAY-ESCODA, C. Efficacy of low-level laser therapy in the management of pain, facial swelling, and postoperative trismus after a lower third molar extraction. A preliminary study. **Lasers Med Sci**, v.27, n.3, p.559-66, May, 2012.

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

LUO, L., SUN, Z., ZHANG, L., LI, X., DONG, Y. e LIU, T. C. Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF-beta1 in skeletal muscle during the repair process. **Lasers Med Sci**, v.28, n.3, p.725-34, May, 2013.

MAIA, M. L., BONJARDIM, L. R., QUINTANS JDE, S., RIBEIRO, M. A., MAIA, L. G. e CONTI, P. C. Effect of low-level laser therapy on pain levels in patients with temporomandibular disorders: a systematic review. **J Appl Oral Sci**, v.20, n.6, p.594-602, Nov-Dec, 2012.

MALMBERG, A. B. e BASBAUM, A. I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. **Pain**, v.76, n.1-2, p.215-22, May, 1998.

MARKOVIC, A. e TODOROVIC, L. Effectiveness of dexamethasone and low-power laser in minimizing oedema after third molar surgery: a clinical trial. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.36, n.3, p.226-9, Mar, 2007.

MARTINS, F. J. C.-F. A. Neurobiological Mechanisms and Perspectives on Far-Infrared Emitting Ceramic Materials for Pain Relief. **Yoga & Physical Therapy**, v.4, n.2, p.2-4, 2014.

MARVIZON, J. C., MCROBERTS, J. A., ENNES, H. S., SONG, B., WANG, X., JINTON, L., CORNELIUSSEN, B. e MAYER, E. A. Two N-methyl-D-aspartate receptors in rat dorsal root ganglia with different subunit composition and localization. **J Comp Neurol**, v.446, n.4, p.325-41, May 13, 2002.

MASFERRER, J. L., ZWEIFEL, B. S., MANNING, P. T., HAUSER, S. D., LEAHY, K. M., SMITH, W. G., ISAKSON, P. C. e SEIBERT, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, n.8, p.3228-32, Apr 12, 1994.

MCNAUGHTON, M. J. M. F. S. W. Y. M. A. P. A. Sensitisation of Nociceptors – What are Ion Channels Doing? **The Open Pain Journal**, v.3, p.82-96, 2010.

MEDEIROS, M. A., CANTERAS, N. S., SUCHECKI, D. e MELLO, L. E. c-Fos expression induced by electroacupuncture at the Zusanli point in rats submitted to repeated immobilization. **Braz J Med Biol Res**, v.36, n.12, p.1673-84, Dec, 2003.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454, n.7203, p.428-35, Jul 24, 2008.

MELZACK, R. Pain and the neuromatrix in the brain. **J Dent Educ**, v.65, n.12, p.1378-82, Dec, 2001.

MENDELL, J. R. e SAHENK, Z. Clinical practice. Painful sensory neuropathy. **N Engl J Med**, v.348, n.13, p.1243-55, Mar 27, 2003.

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

MIDDLETON, E., JR., KANDASWAMI, C. e THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol Rev**, v.52, n.4, p.673-751, Dec, 2000.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v.57, n.1, p.1-164, Jan, 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, v.66, n.6, p.355-474, Apr, 2002.

MORE, A. O., CIDRAL-FILHO, F. J., MAZZARDO-MARTINS, L., MARTINS, D. F., NASCIMENTO, F. P., LI, S. M. e SANTOS, A. R. Caffeine at Moderate Doses Can Inhibit Acupuncture-Induced Analgesia in a Mouse Model of Postoperative Pain. **J Caffeine Res**, v.3, n.3, p.143-148, Sep, 2013.

MUROTANI, T., ISHIZUKA, T., NAKAZAWA, H., WANG, X., MORI, K., SASAKI, K., ISHIDA, T. e YAMATODANI, A. Possible involvement of histamine, dopamine, and noradrenalin in the periaqueductal gray in electroacupuncture pain relief. **Brain Res**, v.1306, p.62-8, Jan 8, 2010.

NAGRA, R. M., BECHER, B., TOURTELLOTTE, W. W., ANTEL, J. P., GOLD, D., PALADINO, T., SMITH, R. A., NELSON, J. R. e REYNOLDS, W. F. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v.78, n.1-2, p.97-107, Sep, 1997.

NOVOSELOVA, E. G., O.; CHERENKOV, D.; CHUDNOVSKI, V.; FESENKO, E. . Effects of lower power laser radiation on mice immunity. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.**, v.22, p.33-38, 2006.

OTSUKA, M. e YOSHIOKA, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiol Rev**, v.73, n.2, p.229-308, Apr, 1993.

OZAWA, S., KAMIYA, H. e TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol**, v.54, n.5, p.581-618, Apr, 1998.

PALECEK, J., NEUGEBAUER, V., CARLTON, S. M., IYENGAR, S. e WILLIS, W. D. The effect of a kainate GluR5 receptor antagonist on responses of spinothalamic tract neurons in a model of peripheral neuropathy in primates. **Pain**, v.111, n.1-2, p.151-61, Sep, 2004.

PARK, D. S., SEO, B. K. e BAEK, Y. H. Analgesic effect of electroacupuncture on inflammatory pain in collagen-induced arthritis rats: mediation by alpha2- and beta-adrenoceptors. **Rheumatol Int**, v.33, n.2, p.309-14, Feb, 2013.

PÉREZ, G. D., I.G.; FALCON, N.D.; FERNÁNDEZ, O. L. Analgesia acupuntural y bloqueos terapéuticos en pacientes con lumbociatalgia. **Rev. Cubana Enfermer.**, v.16, p.111-116, 2000.

PIMENTA, L. H. M. **Laser em medicina e biologia**. São Paulo. 1990

PINTO, M. V. M. **Fototerapia: aspectos clínicos da reabilitação**. São Paulo. 2011. 440 p.

PIOMELLI, D. e SASSO, O. Peripheral gating of pain signals by endogenous lipid mediators. **Nat Neurosci**, v.17, n.2, p.164-74, Feb, 2014.

PLEUVRY, B. J. e LAURETTI, G. R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacol Ther**, v.71, n.3, p.313-24, 1996.

POCKETT, S. Spinal cord synaptic plasticity and chronic pain. **Anesth Analg**, v.80, n.1, p.173-9, Jan, 1995.

QUAH-SMITH, I., SMITH, C., CRAWFORD, J. D. e RUSSELL, J. Laser acupuncture for depression: a randomised double blind controlled trial using low intensity laser intervention. **J Affect Disord**, v.148, n.2-3, p.179-87, Jun, 2013.

RENN, C. L. e DORSEY, S. G. The physiology and processing of pain: a review. **AACN Clin Issues**, v.16, n.3, p.277-90; quiz 413-5, Jul-Sep, 2005.

RICCIOTTI, E. e FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.31, n.5, p.986-1000, May, 2011.

ROCHA, A. P. C. K., D. C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L. R.; BARROS, G. A. M.; GARCIA, J. B. S.; SAKATA, R. K. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. **Rev Bras Anestesiol**, v.57, p.94-105, 2007.

RODGER, K. T., GREASLEY-ADAMS, C., HODGE, Z. e REYNISH, E. Expert opinion on the management of pain in hospitalised older patients with cognitive impairment: a mixed methods analysis of a national survey. **BMC Geriatr**, v.15, n.1, p.56, Apr 29, 2015.

ROMERA, E. P., M.J. ; PERENA, M.F. ; RODRIGO, M.D. . Neurofisiologia del dolor. **Rev. Soc. Esp. Dolor**, v.7, p.11-17, 2000.

ROUND, R., LITSCHER, G. e BAHR, F. Auricular acupuncture with laser. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.2013, p.984763, 2013.

RUSSO, C. M. e BROSE, W. G. Chronic pain. **Annu Rev Med**, v.49, p.123-33, 1998.

SAKURADA, T., KATSUMATA, K., TAN-NO, K., SAKURADA, S. e KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology**, v.31, n.12, p.1279-85, Dec, 1992.

SCHOLZ, J. e WOOLF, C. J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nat Neurosci**, v.10, n.11, p.1361-8, Nov, 2007.

SCOGNAMILLO-SZABO, M. V., BECHARA, G. H., FERREIRA, S. H. e CUNHA, F. Q. Effect of various acupuncture treatment protocols upon sepsis in Wistar rats. **Ann N Y Acad Sci**, v.1026, p.251-6, Oct, 2004.

SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V. R. B., G.H. Acupuncture: Scientific basis and applications. **Ciência Rural**, v.31, n.6, p.1091-1099, 2001.

SEDLAK, J. e LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v.25, n.1, p.192-205, Oct 24, 1968.

SERDIUK, S. E. e GMIRO, V. E. [Peripheral acting mediators pain and analgesia potentiate the central analgesic action of fentanyl and dipyrone]. **Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova**, v.98, n.3, p.325-30, Mar, 2012.

SERHAN, C. N., CHIANG, N. e VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nat Rev Immunol**, v.8, n.5, p.349-61, May, 2008.

SEXTON, J. E., VERNON, J. e WOOD, J. N. TRPs and pain. **Handb Exp Pharmacol**, v.223, p.873-97, 2014.

SHERWOOD, E. R. e TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v.18, n.3, p.385-405, Sep, 2004.

SIEDENTOPF, C. M., KOPPELSTAETTER, F., HAALA, I. A., HAID, V., RHOMBERG, P., ISCHEBECK, A., BUCHBERGER, W., FELBER, S., SCHLAGER, A. e GOLASZEWSKI, S. M. Laser acupuncture induced specific cerebral cortical and subcortical activations in humans. **Lasers Med Sci**, v.20, n.2, p.68-73, Sep, 2005.

SILVEIRA, P. C., SILVA, L. A., FREITAS, T. P., LATINI, A. e PINHO, R. A. Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. **Lasers Med Sci**, v.26, n.1, p.125-31, Jan, 2011.

SILVEIRA, P. C. L. S., L. A.; TUON, T.; FREITAS, T. P.; STRECK, E.L.; PINHO, R. A. Efeitos da laserterapia de baixa potência na resposta oxidativa epidérmica induzida pela cicatrização de feridas **Rev Bras Fisioter**, v.13, p.281-7, 2009.

STUX, G., HAMMERSCHLAG, R. . **Acupuntura clínica**. 2005

SUÁREZ, B. G. V., F.; RABI, M.; ARTEGAS, H., SUAREZ, L. Laser y dolor neuropático. **Rev. Cubana de anestesiología y reanimación**, v.2, n.3, p.37-41, 2003.

TAKANO, T., CHEN, X., LUO, F., FUJITA, T., REN, Z., GOLDMAN, N., ZHAO, Y., MARKMAN, J. D. e NEDERGAARD, M. Traditional acupuncture triggers a local increase in adenosine in human subjects. **J Pain**, v.13, n.12, p.1215-23, Dec, 2012.

TORTORA, G. J., Ed. Corpo Humano, Fundamentos de Anatomia e Fisiologia, p.260-262, fourth ed. 2003.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v.420, n.6917, p.853-9, Dec 19-26, 2002.

TUNER, J. H., L. **Low level laser therapy. Clinical practice and scientific background.** 1999

VALLEJO, R., TILLEY, D. M., VOGEL, L. e BENYAMIN, R. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. **Pain Pract**, v.10, n.3, p.167-84, May-Jun, 2010.

VANEGAS, H. e SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Brain Res Rev**, v.46, n.3, p.295-309, Nov, 2004.

VERRI JR., W. A. C., T. M.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Cytokine Inhibitors and Pain Control **rev bras reumatol**, v.47, n.5, p. 341-353, 2007.

VOSCOPOULOS, C. e LEMA, M. When does acute pain become chronic? **Br J Anaesth**, v.105 Suppl 1, p.i69-85, Dec, 2010.

WALL, P. D. M., R., Ed. Textbook of pain. Londres: **Churchill Livingstone**, p.1-8, fourth ed. 1999.

WANG, H., KOHNO, T., AMAYA, F., BRENNER, G. J., ITO, N., ALLCHORNE, A., JI, R. R. e WOOLF, C. J. Bradykinin produces pain hypersensitivity by potentiating spinal cord glutamatergic synaptic transmission. **J Neurosci**, v.25, n.35, p.7986-92, Aug 31, 2005.

WHITTAKER, P. Laser acupuncture: past, present, and future. **Lasers Med Sci**, v.19, n.2, p.69-80, 2004.

WOOLF, C. J. Pain. **Neurobiol Dis**, v.7, n.5, p.504-10, Oct, 2000.

WOOLF, C. J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. **Ann Intern Med**, v.140, n.6, p.441-51, Mar 16, 2004.

XIA, H., GUAN, L. e YANG, Y. Effect of zusanli (ST 36) moxibustion on rat mesenteric microvascular system. **J Tradit Chin Med**, v.34, n.4, p.491-7, Aug, 2014.

YAKSH, T. L., SORKIN, L.S. . Mechanisms of Neuropathic Pain **Curr Med Chem**, v.5, p.129-140, 2005.

YIM, Y. K., LEE, H., HONG, K. E., KIM, Y. I., LEE, B. R., SON, C. G. e KIM, J. E. Electro-acupuncture at acupoint ST36 reduces inflammation and regulates immune activity in Collagen-Induced Arthritic Mice. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.4, n.1, p.51-7, Mar, 2007.

YIN, C. S., JEONG, H. S., PARK, H. J., BAIK, Y., YOON, M. H., CHOI, C. B. e KOH, H. G. A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Res Vet Sci**, v.84, n.2, p.159-65, Apr, 2008.

YOU, Y., BAI, L., DAI, R., ZHONG, C., XUE, T., WANG, H., LIU, Z., WEI, W., e TIAN, J. Acupuncture Induces Divergent Alterations of Functional Connectivity within Conventional Frequency Bands: Evidence from MEG Recordings. **PloS One**, v.7, n.11, Nov, 2012.

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

ZHANG, R., LAO, L., REN, K. e BERMAN, B. M. Mechanisms of acupuncture-electroacupuncture on persistent pain. **Anesthesiology**, v.120, n.2, p.482-503, Feb, 2014.

ZHAO, Z. Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. *Progress in Neurobiology*, v. 85, p. 355-375, 2008.

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

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, v.429, n.1-3, p.23-37, Oct 19, 2001.

ANEXO

ANEXO A



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 514

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th, 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".


PROCESSO: 23075.066317/2011-00

APROVADO: 05/04/2011 – R.O. 03/2011

TÍTULO: Análise do efeito antinociceptivo e antiinflamatório através da radiação LASER no acuponto E36 (Zusanli) em roedores

AUTORES: Maria Fernanda de Paula Werner, Adair Roberto Soares dos Santos, Cristiane Hatsuko Baggio, Vanessa Erthal

DEPARTAMENTO: Farmacologia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEEA

